

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas
bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**

***Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniera Agrónoma***

AUTORAS:

Mirian Alexandra Llivicura Yunga
María Piedad Pañi Arévalo

DIRECTOR:

Ing. Eduardo José Chica Martínez, Ph.D

CUENCA - ECUADOR

2017



RESUMEN

Los microorganismos, especialmente hongos y bacterias, son muy importantes para el funcionamiento de los suelos agrícolas, desarrollando procesos importantes para el mantenimiento del suelo como un ecosistema. Las comunidades microbianas del suelo son extremadamente diversas; sin embargo, la caracterización y comprensión de esta diversidad es limitada debido al carácter no cultivable del 99% de los microorganismos.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, con el objetivo de determinar las diferencias en caso de existir, en la composición de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional. El trabajo se llevó a cabo analizando 10 pares de muestras de suelo de la zona rizosférica (10 cm), a partir de las cuales se extrajo el ADN metagenómico, se amplificó el ADN ribosomal 16S y la región ITS por PCR con cebadores universales y mediante la aplicación de la técnica de DGGE se obtuvieron imágenes de los perfiles de diversidad. A partir de estos perfiles se estimaron los índices de diversidad y composición bacteriana y fúngica. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas a nivel de las comunidades microbianas entre los dos sistemas de manejo evaluados. Adicional a estos datos, se analizaron las propiedades físico-químicas de los suelos muestreados, encontrando de igual manera resultados similares en los dos sistemas de manejo.

PALABRAS CLAVES: DGGE, BACTERIAS, HONGOS, DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN MICROBIANA.



ABSTRACT

Microorganisms, especially fungi and bacteria, are very important for the functioning of agricultural soils, mediating important processes in the maintenance of the soil as an ecosystem. Soil microbial communities are extremely diverse; however, the characterization and understanding of this diversity remains limited due to the non-culturability of ~99% of the microorganisms inhabiting soils.

The present study was carried out in the Molecular Biology Laboratory of the Agricultural Sciences Faculty at the University of Cuenca, with objective to determine whether there are significant differences in the composition of the microbial communities in vegetable and flower soils under organic and conventional management. The work was carried analyzing 10 pairs of soil samples from the rhizospheric zone (10cm), from which the metagenomic DNA was extracted, the 16S ribosomal DNA and the ITS region were amplified by PCR with universal primers and through the application of the DGGE technique, images of the diversity profiles were obtained. From these profiles we estimated the diversity and bacterial composition and fungal. The results obtained do not show significant differences at the level of the microbial communities between the two management systems evaluated. In addition to these data, we analyzed the physicochemical properties of the sampled soils yielding again no significant differences between both management systems.

KEYWORDS: DGGE, BACTERIA, FUNGI, DIVERSIT AND MICROBIAL COMPOSITION.



INDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	17
4. HIPOTESIS	17
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Sitios de muestreo y lugar de ejecución del proyecto	24
6.1.1. Ubicación geográfica de sitios de muestreo	24
6.1.2. Recolección de muestras.....	25
6.2. Análisis molecular	25
6.2.1. Extracción y purificación del ADN metagenómico.....	25
6.2.2. Amplificación por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	25
6.2.2.1. PCR Hongos (región ITS ADNr)	26
6.2.2.2. PCR Bacterias (gen 16S ADNr)	27
6.2.3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	28
6.3. Determinación de índices de diversidad de comunidades microbianas.	30
6.4. Determinación de la composición de comunidades microbianas.	30
6.5. Determinación de las características físico-químicas de los suelos.	31
6.6. Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS Y DISCUSION	32
7.1. Extracción y purificación de ADN metagenómico.....	32
7.2. Amplificación por PCR del ADN de la región ITS ADNr y gen 16S ADNr. .	32
7.3. Diversidad	38
7.4. Composición	41
7.5. Características físico-químicas del suelo	46
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
9. BIBLIOGRAFIA	49
10. ANEXOS	55



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores de la región ITS ADNr.....	26
Tabla 2. Concentraciones de reactivos para PCR anidada con cebadores para la región ITS ADNr.	27
Tabla 3. Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores para el gen 16S ADNr.....	28
Tabla 4. Riqueza (S), Índice de diversidad de Shannon (H) e índice de equitatividad de Shannon (EH) a partir de perfiles de DGGE.....	40
Tabla 5. Propiedades físico-químicas de suelos hortoflorícolas del Azuay con sistemas manejo orgánico y convencional.	47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principios de la técnica DGGE.	21
Figura 2. Ubicación a nivel provincial y parroquial del área de estudio.	24
Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa del ADN metagenómico extraído de suelos hortoflorícolas bajo sistema de manejo orgánico y convencional.	32
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% (w/v) de los productos de amplificación por PCR de la región ITS ADNr.	32
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% (w/v) de los productos de amplificación por PCR del gen 16S ADNr.	33
Figura 6. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturizante 40-70%.	33
Figura 7. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturizante 30-60%.	34
Figura 8. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturizante 30-55%.	34
Figura 9. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturizante 30-55%.	35
Figura 10. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturizante 30-55%.	36
Figura 11. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturizante 25-55%.	36
Figura 12. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturizante 20-35%.	37
Figura 13. Dendogramas de agrupamiento del gen 16S ADNr.	43
Figura 14. Dendogramas de agrupamiento de la región ITS ADNr.	44
Figura 15. Árbol consenso del gen 16S ADNr.	45
Figura 16. Árbol consenso de la región ITS ADNr.	45



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestras de suelos	55
Anexo 2. Análisis físicos-químicos	55
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN metagenómico.	56
Anexo 4. Equipo para PCR.....	57
Anexo 5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	57
Anexo 6. Concentraciones de reactivos de SuperMix	58



DERECHOS DE AUTOR

Yo, Mirian Alexandra Llivicura Yunga, autora de la tesis “**Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistema de manejo orgánico y convencional**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Febrero del 2017

Mirian Alexandra Llivicura Yunga

C.I: 0105133458



DERECHOS DE AUTOR

Yo, María Piedad Pañi Arévalo, autora de la tesis **“Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Febrero del 2017

María Piedad Pañi Arévalo

C.I: 0105582399



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Mirian Alexandra Llivicura Yunga, autora de la tesis **“Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistema de manejo orgánico y convencional”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Agrónoma. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Febrero del 2017

Mirian Alexandra Llivicura Yunga

C.I: 0105133458



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, María Piedad Pañi Arévalo, autora de la tesis **“Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Agrónoma. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Febrero del 2017

María Piedad Pañi Arévalo

C.I: 0105582399



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Chica, director de tesis y al Dr. Andrés Yarzabal, Prometeo-investigador, por los conocimientos compartidos durante el desarrollo práctico y teórico del presente tema de tesis; como también a los miembros del proyecto “Metagenómica de las Comunidades Microbianas en Suelos Agrícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por la financiación del proyecto de investigación.

A los agricultores hortoflorícolas, por facilitarnos las muestras de suelo para el desarrollo de la misma.

A nuestros compañero/as: Julia, Janeth, Marisol, Carlos, Diego, Jeancarlos, Luis y Xavier por su amistad y compañía durante la formación académica.

Alexandra &Piedad



DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis va dedicado con cariño:
A mis padres, hermanos y sobrinos
A mi esposo e hijo
Gracias por su amor, apoyo y constante compañía.

Alexandra



DEDICATORIA

Esta tesis dedico a mis padres, hermanos y sobrinas.
Gracias infinitas por permitirme crecer, vivir en familia
y estar juntos en el camino de la vida, enseñándome
que la felicidad no es la meta sino el camino.

Con cariño Piedad



1. INTRODUCCIÓN

Azuay es considerada “una provincia preferentemente agrícola” ocupando el noveno lugar en área de suelo cultivada en el Ecuador (INEC 2011).

En algunas zonas de la referida provincia como Gualaceo, Santa Isabel, Sayausí y San Joaquín es de gran importancia la producción de hortalizas y flores (Durán Maldonado y Jerves Galarza 2015), destacándose la última zona, ya que por más de sesenta años se ha dedicado a la agricultura en parcelas pequeñas, en las que se practica la asociación y rotación de cultivos, con la finalidad de que una especie proteja a la otra (Tapia 2014), su producción es destinada al autoconsumo y a la venta en los mercados locales y regionales.

Sin embargo, el estudio de estos suelos se ha enfocado principalmente en determinar los componentes físicos y químicos, dejando de lado el componente biológico (Acuña et al. 1998), olvidando que la interacción de los tres componentes genera un suelo de calidad para la producción agrícola (Bernal Gómez 2015).

El componente biológico del suelo comprende una gran diversidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, algas, etc. (De Felipe Antón 2004), los cuales pueden vivir solos o en asociación con las raíces de las plantas sin causarles daño alguno. También son responsables del 80 al 90% de la actividad biológica del suelo, desempeñando funciones de descomposición de la materia orgánica (Vallejo et al. 2010), interviniendo en el ciclaje y disponibilidad de nutrientes para las plantas (Yao et al. 2000), y actuando positivamente en la fertilidad, estabilidad y funcionamiento del agroecosistema (Acuña et al. 1998).

Por la necesidad de estudiar e identificar a los microorganismos del suelo, se ha recurrido a los métodos dependientes de cultivo, los mismos que han limitado la comprensión de la diversidad microbiana, debido a que aproximadamente alrededor del 99% de los microorganismos en ambientes naturales no pueden ser cultivados en el laboratorio con las técnicas tradicionales (Díaz y Wachter 2003).

Estos métodos no garantizan que se esté evaluando a toda la diversidad microbiana presente, debido a que en la fase del cultivo se ven favorecidos los microorganismos con mayores tasas de crecimiento, dificultando el desarrollo de aquellos que tienen tasas de crecimiento bajas (Garbeva et al. 2004). Por otra parte, aún no ha sido posible



reproducir en el laboratorio las condiciones que cumplan con los requerimientos nutricionales y ambientales de la gran mayoría de las bacterias y hongos del suelo (Nannipieri et al. 2003).

Pese a que en los últimos años los estudios del componente biológico de los ecosistemas naturales basados en técnicas de biología molecular han experimentado un gran aumento, su aplicación en la ciencia del suelo aún es muy escaso (Nogales 2010). Hasta donde hemos podido investigar, en Ecuador se han reportado estudios sobre microorganismos del suelo basados principalmente en técnicas dependientes de cultivo (Bernal Gómez 2015); sin embargo, no hemos encontrado estudios que reporten la composición y diversidad de las comunidades microbianas en suelos agrícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional basados en métodos moleculares.

Los métodos moleculares basados en el estudio del material genético (ADN o ARN), permiten tener acceso a “perfiles” representativos de la estructura poblacional en una comunidad asociada a determinado hábitat, lográndose así tener una aproximación más cercana de las poblaciones de microorganismos cultivables y no cultivables (De La Cruz Leyva et al. 2014).

Cabe mencionar que el presente estudio forma parte del proyecto de investigación **“Metagenómica de comunidades microbianas en suelos agrícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional”**, el mismo que se encuentra ejecutando por un grupo de investigadores del área de manejo integral de suelos y biotecnología de la Carrera de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. El proyecto pretende caracterizar las comunidades microbianas de suelos agrícolas -orgánicos y convencionales- e identificar agentes biológicos de interés agrícola y biotecnológico en una diversidad de cultivos de interés nacional como: banano, cacao, frutales, café, hortalizas, flores, etc. En nuestro caso con este estudio pretendemos determinar las diferencias, en caso de existir, en la composición de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas, bajo sistemas de manejo orgánico y convencional mediante la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).



2. JUSTIFICACIÓN

Gran parte de la población del Ecuador, especialmente en las zonas rurales, sostiene su economía en base a la producción agropecuaria (Charvet 2012). Se destacan los agricultores de la Sierra como principales productores hortícolas y florícolas, concentrándose la mayor parte de ellos en las provincias de Cotopaxi, Pichincha, Imbabura y Azuay. El incremento de la horticultura en nuestro país se dio a raíz de las exportaciones de brócoli, espárragos, palmito, etc. (FAO 2004); mientras que el crecimiento del sector florícola se dio con la producción de rosas y flores de verano que son consideradas las mejores del mundo por su calidad y belleza (PROECUADOR 2013).

El sistema de manejo empleado para los cultivos hortícolas y florícolas está basado en la aplicación de materia orgánica y fertilizantes sintéticos (Caiza Paucar 2007), realizada sin un diagnóstico previo sobre las necesidades de nutrientes de las plantas ni sobre la disposición de nutrientes aprovechables presentes en el suelo, lo que conlleva a una alteración en la microbiota del suelo (Van Diepeningen et al. 2006).

Los métodos tradicionales usados para estudiar la microbiología del suelo no permiten revelar la verdadera diversidad microbiana presente en un determinado hábitat, ya que sólo una pequeña proporción de los microorganismos viables se recupera por medio de cultivo (Rondon et al. 2000).

Por ello y al no existir aún en nuestro país estudios de mayor profundidad investigativa sobre el impacto que generan los diferentes sistemas de manejo sobre las comunidades microbianas de los suelos hortoflorícolas, resulta interesante aplicar una de las técnicas moleculares conocida como DGGE para este tipo de estudio.

La DGGE es una técnica basada en el análisis de la constitución genética de los microorganismos mediante la extracción del ADN de las muestras, amplificación de ciertos genes o marcadores moleculares- mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores universales 16S (Cedeño 2005) e ITS (White et al. 1990) y migración a través del gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante.

Mediante el análisis de los perfiles generados por DGGE podemos calcular la riqueza, el índice de diversidad de Shannon y el índice de equitatividad de Shannon, datos útiles para comprender el impacto de cada sistema de manejo sobre la composición y diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de hortalizas y flores del Azuay.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar diferencias en la composición de comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar índices de diversidad de las comunidades microbianas que habitan en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.
- Comparar la composición de las comunidades microbianas entre suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

4. HIPOTESIS

Existen diferencias en la composición y diversidad de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.



5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El suelo, con sus propiedades químicas, físicas y biológicas, es considerado uno de los ambientes más diversos y heterogéneos (Suárez 2010) es capaz de albergar una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Las bacterias alcanzan el 70% de la microflora del suelos y representan los microorganismos más abundantes en cantidades de 10^8 a 10^{10} por cada gramo de suelo (Hernández et al. 2010). Poseen un tamaño entre 0.4 y 5 micrómetros (μm), se las clasifica de acuerdo a su morfología, por ejemplo: cocos (forma esférica), bacilos (forma de bastón), espirilos (forma espiral), entre otros (Brito Espinoza 2014). Por otra parte, los hongos ocupan del 1 al 3% de la microflora del suelo, observándose como esporas o como micelios fúngicos, participando en asociaciones micorrícicas, actuando como descomponedores de la materia orgánica y como agentes productores de enfermedades (Godeas 1983).

Generalmente, la mayor abundancia de biomasa microbiana se encuentra en los primeros 0 a 10 cm de la superficie del suelo, disminuyendo con la profundidad, el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes (Fierer et al. 2003). Según Will et al. (2010), la mayoría de las secuencias de ADN ribosomal afiliados a Actinobacteria, Bacteroidetes, Cianobacterias, Fibrobacteres, Firmicutes, Espiroquetas, Verrucomicrobia, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, y Gammaproteobacteria se derivan del horizonte A.

Desde el punto de vista agrícola, los microorganismos cumplen un rol fundamental en el mantenimiento del suelo como ecosistema, participando en procesos de descomposición de la materia orgánica y ciclaje de los nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, hierro, etc.) (Nogales 2005). Algunos microorganismos producen componentes bioactivos como vitaminas, hormonas y enzimas que estimulan el crecimiento vegetal (Higa y Parr 1993), como también contribuyen al control de estrés vegetal y supresión de enfermedades (Sarabia Ochoa et al. 2010).

Las propiedades físico-químicas también son muy importantes para evaluar la calidad del suelo; así, el pH puede definir la supervivencia de los microorganismos existiendo una mayor actividad bacteriana en un rango de pH de 6,0- 7,5; en cambio, el mayor número de hongos aparece en valores de pH de 5 a 6, donde son capaces de competir con los actinomicetos y otras bacterias (FAO, 2013b). La densidad aparente (D_a)



refleja la porosidad total del suelo: valores bajos ($<1,3 \text{ kg dm}^{-3}$) indican una condición porosa del suelo y valores altos indican un ambiente pobre para el crecimiento de raíces, poca aireación e infiltración reducida del agua.

En efecto, la densidad aparente es un parámetro importante para la función del ecosistema (FAO 2009). De igual manera, la materia orgánica influye sobre la fertilidad, aportando nutrientes, mejorando la porosidad, la estructura y la biodiversidad de microorganismos. Por otra parte, la textura indica el contenido relativo de partículas de diferente tamaño en el suelo, como arena (mayor tamaño), limo y arcilla (menor tamaño); finalmente, la porosidad está determinada por poros o pequeños espacios que quedan al agruparse las partículas que forman el suelo, a través de los cuales ingresa el aire y el agua (FAO 2013). Así, todas las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo son indicadores en la relación suelo-microorganismos-planta (Nogales 2010).

Adicionalmente, dichas propiedades dependen del tipo de manejo que se aplica, siendo la agricultura convencional y la orgánica las más practicadas. El sistema convencional tiene un papel importante en el mejoramiento de la demanda productiva; sin embargo, este sistema depende en gran medida de insumos sintéticos (químicos) de aplicación intensiva. Por otra parte, el sistema orgánico no utiliza fertilizantes sintéticos ni pesticidas; más bien, hace uso de los recursos de la propia finca, tratando de utilizar la menor cantidad de insumos externos (Araújo et al. 2009).

Algunos investigadores coinciden en afirmar que los diferentes sistemas de cultivo pueden cambiar las propiedades del suelo, afectando especialmente a los microorganismos (Monokrousos et al. 2006), siendo la diversidad y abundancia microbiana del suelo significativamente mayor en el manejo orgánico en comparación con el convencional (Järvan et al. 2014). Sin embargo, Shannon et al. (2002) encontraron que las diferencias en las comunidades microbianas en suelos con diferente manejo fueron leves y que en muchos de los parámetros físicos medidos no se encontraron diferencias significativas. De la misma manera, Bowles et al. (2014) reportaron que el manejo orgánico influyó fuertemente en la actividad de las enzimas del suelo, pero sin un efecto importante en las comunidades microbianas.



Las comunidades de microorganismos más difíciles de estudiar son las bacterias y hongos, debido a su enorme diversidad genética y fenotípica (Øvreås y Torsvik 1998). Se estima que al menos el 99% de bacterias que se pueden observar con el microscopio no pueden ser cultivadas con técnicas de laboratorio comunes (Borneman y Triplett 1997); al igual que las bacterias, una fracción muy pequeña de hongos presentes en el suelo pueden ser cultivados (Garbeva et al. 2004).

El desarrollo de técnicas moleculares ha posibilitado el estudio de comunidades microbianas antes inexploradas, presentando ventajas sobre los métodos tradicionales. Así, con las técnicas moleculares, no es indispensable el crecimiento previo de microorganismos del suelo en condiciones “in vitro”, reduciendo el tiempo para procesar una muestra y aumentando la capacidad de resolución.

Estas técnicas moleculares se basan en la extracción de ADN directamente de las muestras de suelo (Castillo Monroy et al. 2016), el cual posteriormente se usa como molde para la amplificación, por PCR (por sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction), de los genes ribosomales u otros marcadores moleculares existentes en la muestra. Esta técnica se realiza con una ADN-polimerasa termoestable y oligonucleótidos complementarios (cebadores universales) con las regiones conservadas de los genes ribosomales, con el fin de obtener una estimación de la diversidad microbiana del suelo (González y Fierro 2009).

Tradicionalmente, regiones de ADN genómico que codifican para el 16S ARNr (procariotas), 18S ARNr o ITS (eucariotas) son la clave para el diseño de cebadores para el estudio de la diversidad, ya que estos genes o marcadores están presentes en todos los microorganismos y poseen regiones definidas para su clasificación taxonómica (Suárez 2010). El gen 16S ADN_r se encuentra en todas las procariotas, su transferencia es vertical, es decir, el gen solo se transfiere entre la misma especie de una célula a sus descendientes y el análisis de su secuencia permite hacer una identificación rápida a partir de una base de datos pública que contiene un amplio número de secuencias bacterianas (Brito Espinoza 2014).

La aplicación de ciertas técnicas moleculares como DGGE / TTGE, SSCP, RAPD, ARDRA, T-RFLP, LH-PCR, RISA y RAPD (Rastogi y Sani 2011), han permitido obtener información sobre la composición y estructura de comunidades microbianas, así como también, han posibilitado establecer el impacto de los factores ambientales

sobre las mismas (Muyzer 1999). Generalmente, la técnica de DGGE es una de las más utilizadas para el estudio de microorganismos de muestras ambientales.

La Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Agente Desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés), se basa en la extracción del ADN metagenómico, su amplificación mediante PCR, usando cebadores universales o específicos y la posterior separación de los fragmentos amplificados en geles de acrilamida en presencia de agentes desnaturalizantes.

La técnica se fundamenta en la separación de fragmentos específicos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos (CG). La separación de los fragmentos de ADN y su movilidad depende de la abundancia de la composición de nucleótidos -guanina-citosina (G-C) y adenina-timina (A-T)- y de la concentración de los agentes desnaturalizantes (urea y formamida), presentes en el gel de poliacrilamida, la cual influye en la temperatura de fusión de los fragmentos (Ferris et al. 1996). De esta forma, cuando las moléculas de ADN bicatenario alcanzan una determinada temperatura y concentración de agentes desnaturalizantes, se separan total o parcialmente y disminuyen su velocidad de migración en el gel, dando como resultado la aparición de diferentes bandas (Kisand et al. 2005) (Figura 1).

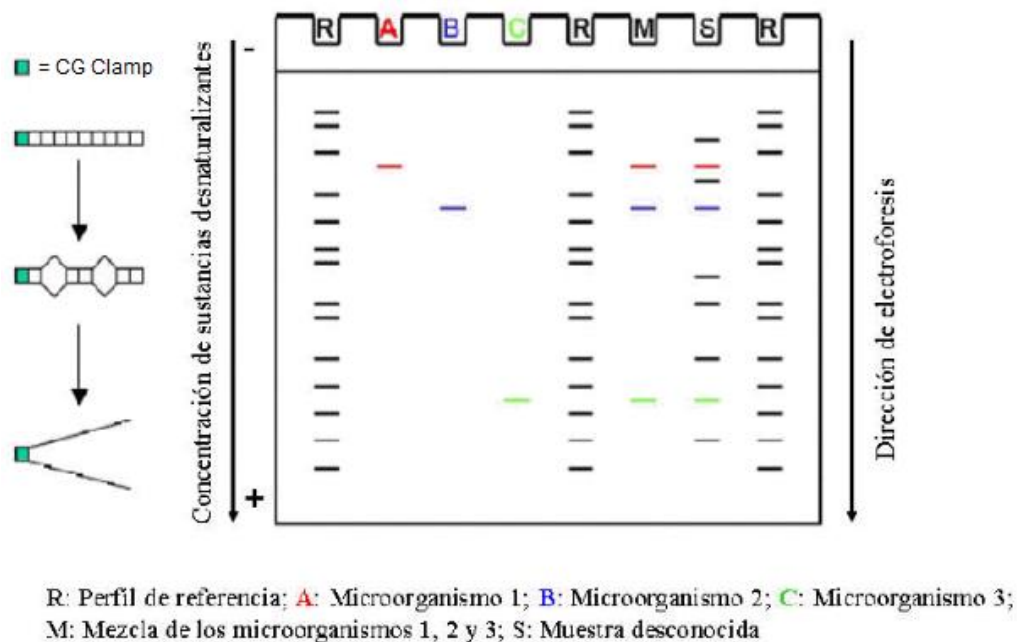


Figura 1. Principios de la técnica DGGE.

Fuente: http://www.durga.org.es/webdelparto/agentes_etiolgicos_de_infecciones_de_pezones_mastitis_infecciosas.htm



Cada banda corresponde a una unidad taxonómica operativa (OTU), que teóricamente representa una población microbiana diferente presente en la comunidad. Además, la intensidad de las bandas se puede relacionar con la abundancia relativa de dicho OTU en la comunidad (Shannon et al. 2002).

La técnica DGGE permite determinar índices de diversidad, parámetro que depende de dos componentes: la riqueza o abundancia, que es el número total de especies presentes, y la equitatividad, que es la distribución de individuos entre esas especies (Gonzalez et al. 2014). Una de las grandes ventajas de utilizar DGGE es poder detectar microorganismos de carácter “no cultivables”; además permite analizar al mismo tiempo múltiples muestras a bajo costo, así como también evaluar las diferencias y similitudes entre las mismas (Fernández y Le Borgne 1987).

Por otro lado, la técnica permite realizar comparaciones de las comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes sitios en ecosistemas similares, o en función del tiempo y en presencia de diferentes condiciones ambientales. Finalmente, es posible recuperar cada una de las bandas de los perfiles del gel, pudiendo ser aisladas y secuenciadas para la identificación de las especies (Muyzer y Smalla 1998).

Sin embargo la técnica de DGGE también presenta desventajas ya que solamente puede detectar poblaciones que representen más del 1% de los microorganismos totales de una comunidad, es decir solo las especies dominantes (Muyzer 1999).

Por otro lado, la técnica está sujeta a una relativa limitación en cuanto al tamaño máximo de los fragmentos a separar (500 pb). Además, distintos fragmentos de ADN que difieren en su secuencia pueden presentar características similares de movilidad dentro del gel de poliacrilamida, por lo tanto los diferentes fragmentos migran juntos, dificultando su diferenciación (Brons y Van Elsas 2008); por el contrario, una misma especie puede llegar a generar más de una banda en el perfil de DGGE, debido a la existencia de múltiples copias del gen que difieren ligeramente en sus secuencias (Maarit Niemi et al. 2001), o debido a la formación de moléculas heteroduplex durante la PCR. Por otro lado, la técnica también incluye sesgos a nivel de la extracción de DNA y la PCR por la formación de quimeras y amplificación inespecífica de los blancos seleccionados (Von Wintzingerode et al. 1997).



A partir de los perfiles obtenidos se puede determinar la dominancia, frecuencia, proporción relativa, entre otros indicadores de diversidad mediante métodos estadísticos no paramétricos. Estos indicadores pueden ser utilizados en estudios de dinámica poblacional, dando una mejor visión del comportamiento y evolución de las comunidades microbianas a través del tiempo (Cedeño 2005).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitios de muestreo y lugar de ejecución del proyecto

Las muestras de suelo hortícolas y florícolas bajo sistemas de manejo orgánico y/o convencional fueron recolectadas en la Provincia del Azuay en las parroquias: San Joaquín, San Bartolomé, Sayausí y La Unión (Figura 2).

La fase experimental se desarrolló en la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el Laboratorio de Biología Molecular.

6.1.1. Ubicación geográfica de sitios de muestreo

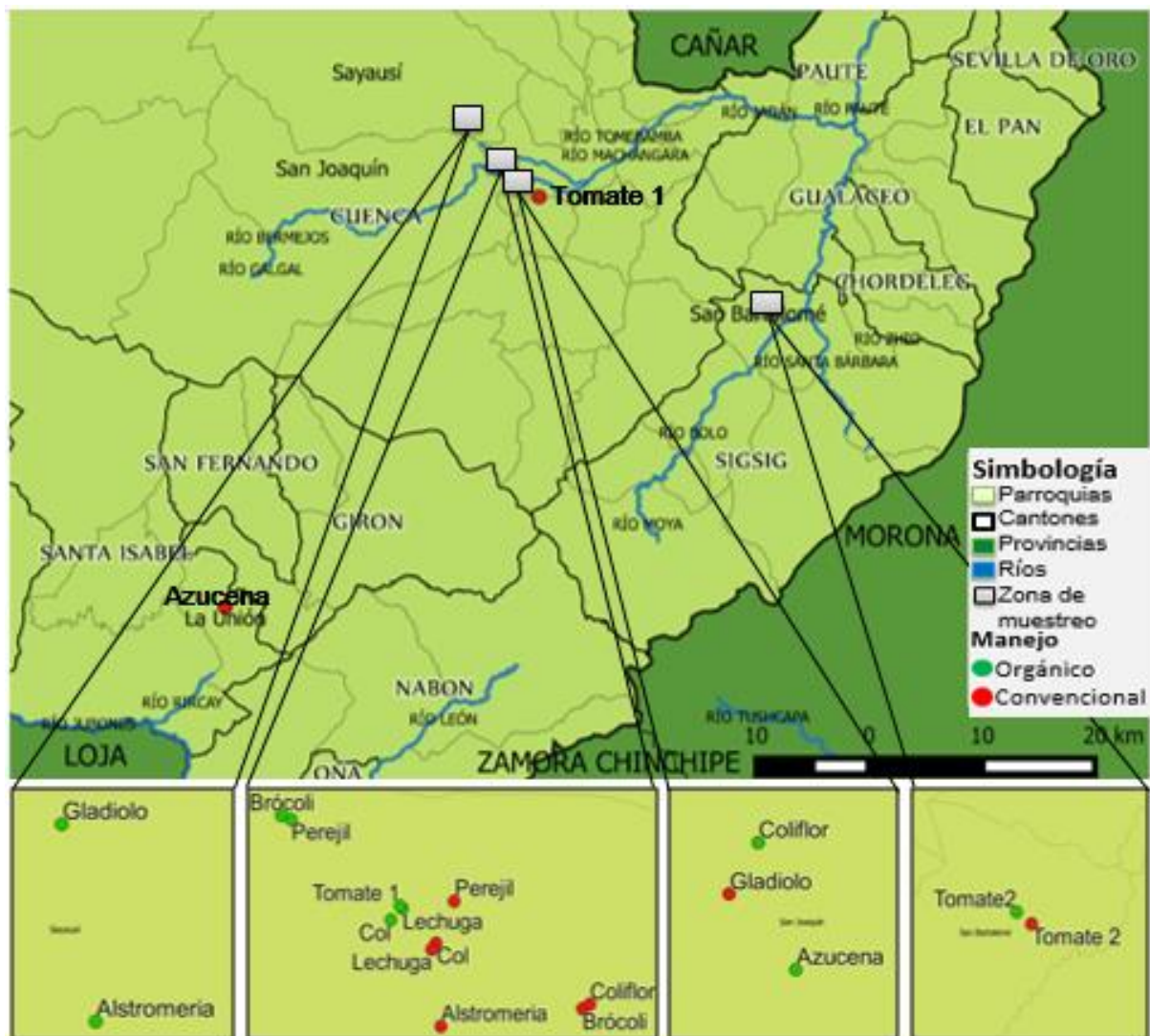


Figura 2. Ubicación a nivel provincial y parroquial del área de estudio.



6.1.2. Recolección de muestras

Para la recolección de las muestras se seleccionaron 10 pares de sitios con cultivos de hortalizas o flores bajo sistemas de manejo orgánico y convencional (Anexo 1) ubicados dentro de la provincia del Azuay; previo a la recolección de las muestras se realizó un levantamiento de información a través de una encuesta para conocer el manejo del suelo y del cultivo. Los pares muestreados fueron geo-referenciados y estuvieron ubicados lo más cercanamente posible el uno del otro para minimizar variaciones ambientales.

En cada sitio seleccionado se colectó una muestra de suelo de la zona rizosférica a 10 cm de profundidad para el análisis molecular; una muestra en un anillo de Kopecky y 500 gramos para los análisis físico-químicos. Las muestras para el análisis molecular fueron almacenadas y congeladas por separado en viales a -20°C , hasta su correspondiente análisis y las muestras para el análisis físico-químico fueron trasladadas al Laboratorio de Suelos para el respectivo procesamiento y toma de datos.

6.2. Análisis molecular

6.2.1. Extracción y purificación del ADN metagenómico

El ADN metagenómico de cada muestra colectada se obtuvo por extracción a partir de 0,25 gramos de suelo usando el kit de aislamiento de ADN de suelos *Powersoil® DNA isolation kit* (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante (Anexo 3). Se verificó el éxito de la extracción del ADN metagenómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) con amortiguador TAE 1X. Para cargar en el gel, a cada muestra se le agregó 0,5 μl de SYBER GREEN™, 1 μl de Blue Juice™ 10X y 5 μl de ADN metagenómico y se incluyó un marcador de longitud molecular (TrackIt 1 kb plus DNA ladder™, Invitrogen), para verificar el tamaño de los fragmentos. Las condiciones de separación fueron a 80 voltios por 30 minutos; finalmente la visualización se realizó en un foto-documentador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

6.2.2. Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas y fúngicas asociados a la zona rizosférica de suelos hortoflorícolas, se requirió la optimización de las condiciones de desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

6.2.2.1. PCR Hongos (región ITS ADNr)

El ADN metagenómico aislado se usó como molde para amplificar, mediante *Touchdown* PCR la región ITS ADNr de la comunidad fúngica; para ello se utilizaron cebadores universales ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'), e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Tabla 1), que amplifican una región de aproximadamente 1400 pb.

La amplificación se realizó en un Termociclador Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf (Anexo 5) con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de hibridación (*touchdown*) a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos (disminuyendo 1°C por cada ciclo), seguido por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Liu et al. 2015).

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores de la región ITS.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM
dNTPs	10 mM	0.5 mM
Cebador ITS1F	10μM	0.2 μM
Cebador ITS4	10μM	0.2 μM
Taq_polimerasa	1U/μl	1U

A partir del producto de la primera amplificación se realizó un segundo PCR (PCR anidado) utilizando los cebadores ITS1FGC (5'-CGC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA -3') e ITS2 (5'-GCT GCG TTC ATC GAT GC-3'). El volumen final para cada reacción fue de 50 μl (Tabla 2).

El perfil térmico programado para la amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de hibridación a 94°C por 45 segundos, 55°C por 75 segundos, 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos (Wu et al. 2013).

**Tabla 2.** Concentraciones de reactivos para PCR anidada con cebadores para la región ITS.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x
MgCl₂	50 mM	2.5 mM
dNTPs	10 mM	0.5 mM
Cebador ITS1FGC	10 μ M	0.2 μ M
Cebador ITS2	10 μ M	0.2 μ M
Taq_polimerasa	1U/ μ l	1U

6.2.2.2. PCR Bacterias (gen 16S ADNr)

Al igual que en los hongos, el ADN metagenómico aislado se utilizó como molde para amplificar por PCR un fragmento interno del gen ADNr 16S que codifica la región variable V6 y V8 de aproximadamente 420 pb. Se utilizó cebadores universales F968 (5'- GC-CGC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CGC CCC CGC CCC AAC GCG AAG AAC CTT AC -3' y 1401R (5'- CGC CCG CGC CCC GCC CGG CCC GCC CCC GCC CCA ACG CGA AGA ACC TTAC -3') .

Para la amplificación se utilizó los componentes de *Platinum® PCR SuperMix* (Anexo 6) para un volumen total de 50 μ l (Tabla 3).

Se utilizó el perfil térmico descrito por Brons y Van Elsas (2008) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 10 ciclos de amplificación (*touchdown*) a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos (disminuyendo 1°C por cada ciclo); seguido por 25 ciclos de amplificación (estándar) a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos; seguido de una extensión final a 72°C por 30 minutos.

**Tabla 3.** Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores para el gen 16S.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Platinum® PCR SuperMix		1x
Cebador F968GC	50 μ M	0.2 μ M
Cebador 1401R	50 μ M	0.2 μ M
ADN metagenómico		< 500 ng

En todas las reacciones se incluyó una muestra sin ADN metagenómico como control negativo de amplificación.

La amplificación por PCR de la región ITS ADNr y del gen 16S ADNr se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) con buffer TAE 1X. A cada muestra se le incluyó 0.5 μ l de SYBER GREEN, 1 μ l de Blue Juice 10X y 5 μ l de ADN. Las condiciones de separación fueron a 80 voltios por 30 minutos. Para conocer los tamaños moleculares de las bandas se utilizó un marcador de longitud molecular (TrackIt 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen); se observó y foto-documentó los geles utilizando un transiluminador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

6.2.3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La separación de los fragmentos amplificados por PCR, en función de la secuencia de nucleótidos se llevó a cabo mediante DGGE. Para determinar las condiciones de desarrollo de DGGE y el gradiente de desnaturización que producía el mejor perfil de bandas se evaluaron los gradientes desnaturizantes 30-80% (Wu et al. 2013), 40-70%, 30-60%, 30-55% con 6% de acrilamida y finalmente 35-55% al 7% de acrilamida para el gen 16S ADNr.

De la misma forma para la región ITS ADNr se evaluaron los siguientes gradientes: 30-55% (Wu et al. 2013), 25-40% y 20-35% al 8% de acrilamida.

Para la corrida electroforética en ambos casos se preparó y ensambló el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones descritas por Zwart y Bok (2004). Cada gel estuvo constituido por tres secciones: zona de sellado o tapón para las fugas ubicado en la parte inferior (contiene 1,5 ml de solución al 0% de desnaturizante, 9 μ l de persulfato de amonio y 1,5 μ l de TEMED); gradiente químico desnaturizante (contiene 13 μ l de solución de mayor o menor



concentración, 78µl de persulfato de amonio y 13 µl de TEMED) y *stacking* (contiene 3 ml de solución al 0% de desnaturalizante, 18 µl de persulfato de amonio y 3 µl de TEMED).

El gradiente químico desnaturalizante se preparó utilizando urea-formamida siguiendo las indicaciones descritas por Muyzer et al. (1993); en el caso de los hongos se preparó y cargó el gel de poliacrilamida al 8 % (w / v) de acrilamida: bisacrilamida (37,5: 1) en un tampón TAE 0,5X con diferentes gradientes desnaturalizantes de urea-formamida. Las soluciones contienen desde 20% a 35% de desnaturalizante [donde el 100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v / v) de formamida]. Igualmente con las mismas condiciones se preparó el gel para las bacterias con poliacrilamida al 7 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37,5: 1) en un tampón TAE 0.5X con diferentes gradientes desnaturalizantes de urea-formamida. Las soluciones contienen desde 35% a 55 % de desnaturalizante [donde el 100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v / v) de formamida].

Una vez ensamblado el equipo, se procedió a cargar las muestras de ADN amplificado al gel; para ello se hicieron mezclas de 3µl de Bluejuice 6X más 15µl de ADN en un tubo de microcentrifuga de 1,5ml.

La corrida electroforética se realizó durante 14 horas a un voltaje constante de 80 V con una temperatura de 60°C (Correa et al., 2007).

Transcurrido el tiempo de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos utilizando SYBR Green 2X en tampón TAE 0.5X durante 30 minutos, a temperatura ambiente en un lugar oscuro; posteriormente las imágenes se visualizaron y foto-documentaron con un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System para su posterior análisis (Anexo 5).



6.3. Determinación de índices de diversidad de comunidades microbianas.

A través del procesamiento de imágenes de los perfiles de DGGE en el programa bioinformático Gel Analyzer se calcularon los índices de diversidad como:

- Riqueza de especies (S): Se define como el número de diferentes organismos presentes en una muestra (número de bandas presentes en DGGE). No toma en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad. Se calcula según la siguiente ecuación:

$$S = N^{\circ} \text{ de bandas detectadas}$$

- Índice de Shannon–Weaver: Esta medida se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE. Toma en consideración el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual, calculándose según la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum P_i \cdot \ln P_i$$

Donde P_i es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

- Índice de Equitatividad de Shannon: Se define como una medida que expresa qué tan similar es la abundancia de diferentes especies. Se calcula a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H) según la siguiente ecuación (Cedeño 2005):

$$E = H / \ln (S)$$

6.4. Determinación de la composición de comunidades microbianas.

Las similitudes de los perfiles electroforéticos se analizaron en el software PyElph, obteniéndose dendogramas de agrupamiento jerárquico de enlaces promedio no ponderado, tanto para hongos como para bacterias con los distintos algoritmos de clasificación jerárquica como: UPGMA, WPGMA, SINGLE LINKAGE, COMPLETE LINKAGE y NEIGHBOR JOINING.

Con los datos de los algoritmos de clasificación jerárquica y mediante el software PHYLIP 3.6, se construyó un árbol consenso para hongos y un árbol consenso para bacterias.



6.5. Determinación de las características físico-químicas de los suelos.

Las muestras de suelo se sometieron a análisis físico-químico (Anexo 2). Los datos de pH se obtuvieron por el método del potenciómetro, utilizando una solución en relación 1:2,5 (suelo/agua) (FAO 2009); la conductividad eléctrica (CE) se determinó por el método del conductímetro utilizando una solución de 0,5:2,5 (suelo/agua). Por otra parte, la textura se determinó por el método del hidrómetro o Bouyoucos con una solución acuosa de relación 1:50 (suelo/agua), la densidad aparente (D_a) por el método del cilindro biselado (FAO 2009), la densidad real (D_r) por el método del picnómetro utilizando 2 gramos de suelo, el porcentaje de materia orgánica (%MO) por el método de calcinación a partir de 10 gramos de suelo (Schumacher 2002) y se calculó el porcentaje de carbón orgánico (CO), porosidad y humedad a partir de los datos de MO, densidad aparente y densidad real respectivamente (Jaramillo 2002).

6.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23.0 aplicando la prueba de t-student con valor $p \leq 0,05$, para obtener la significancia de los datos.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Extracción y purificación de ADN metagenómico

Se puede observar el éxito de la extracción del ADN metagenómico total a partir de los diez pares de muestras de suelo, con la presencia de una sola banda intensa e integra (libre de fragmentación), a una altura aproximada de 12.000 pb (Figura 3).

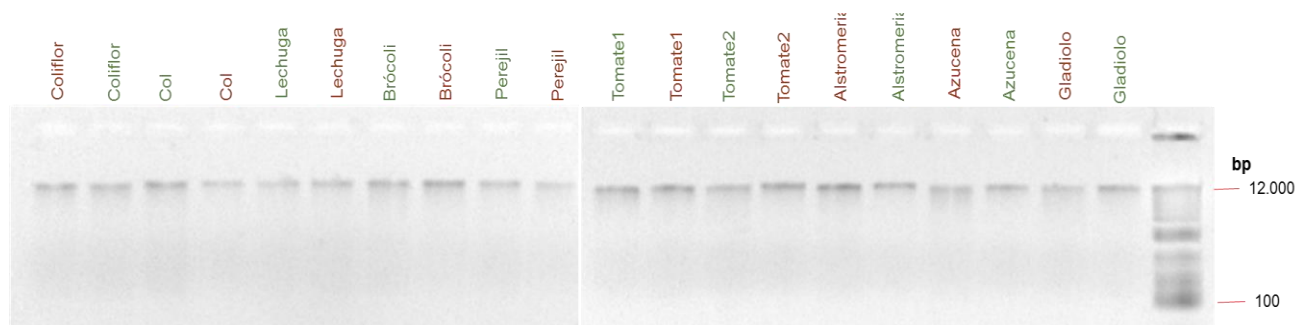


Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa del ADN metagenómico extraído de suelos hortoflorícolas bajo sistema de manejo orgánico y convencional.

7.2. Amplificación por PCR del ADN metagenómico de la región ITS ADNr y gen 16S ADNr.

De la misma manera se verificó la presencia de ADN en los productos de amplificación por PCR de la región ITS ADNr, el cual generó un fragmento de aproximadamente 300 pb (Figura 4). Mientras que para el gen 16S del ADNr, los amplicones obtenidos tuvieron un tamaño aproximado de 600-650 pb (Figura 5). En los dos casos se obtuvo bandas integras y definidas lo que indica el éxito de la amplificación.

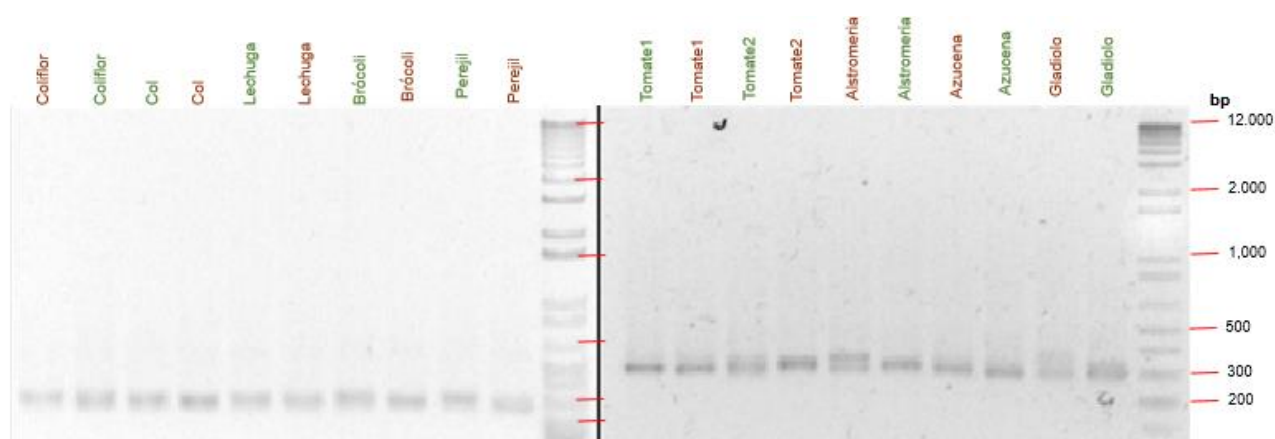


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% (w/v) de los productos de amplificación por PCR de la región ITS ADNr.

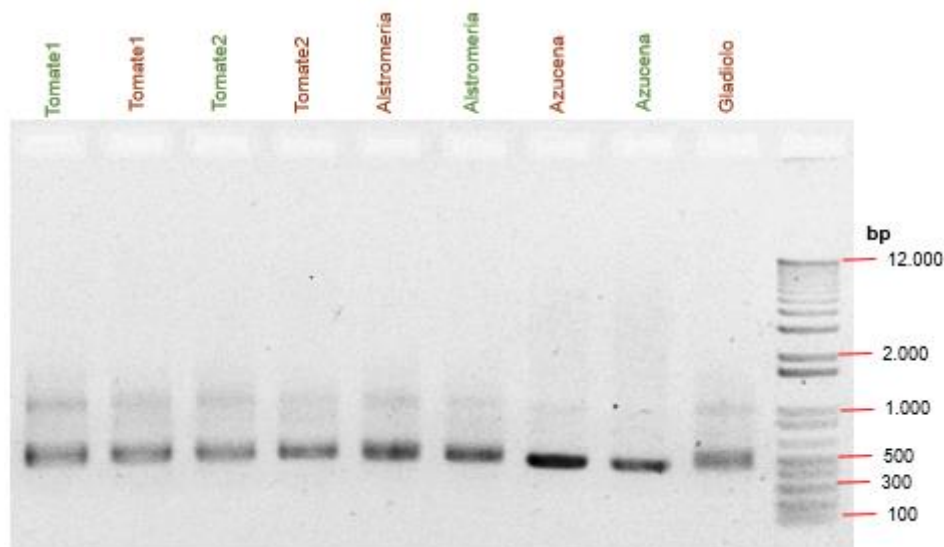


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% (w/v) de los productos de amplificación por PCR del gen 16S ADNr.

Una vez obtenido el primer gel de los perfiles de diversidad del gen 16S ADNr, mediante DGGE con gradiente desnaturalizante 40%-70% (urea y formamida) al 6% de acrilamida, se pudo observar una mayor acumulación de bandas en la parte superior, debido a las altas concentraciones de urea y formamida, lo cual interrumpe completamente la migración de los fragmentos en el gel (Figura 6). Además se pudo apreciar la formación de burbujas en el gel.



Figura 6. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante 40%-70%.

El siguiente perfil de diversidad obtenido con gradiente 30% - 60%(urea y formamida) al 6% de acrilamida muestra una mejora en la migración, pero aun presenta bandas comprimidas siendo confusa su interpretación y los fragmentos de ADN se encuentran ubicados en la parte inferior con poca definición (Figura 7), por lo que se requirió un nuevo ensayo con diferente gradiente desnaturalizante.

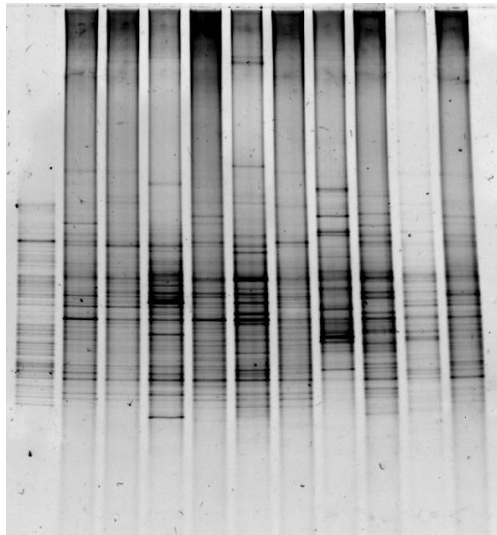


Figura 7. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante 30%-60%.

Posteriormente se obtuvo el perfil de diversidad con gradiente 30%-55% (urea y formamida) al 6% de acrilamida, en donde se observan pocas bandas definidas, y en su mayoría ubicados en la parte inferior del gel (Figura 8).

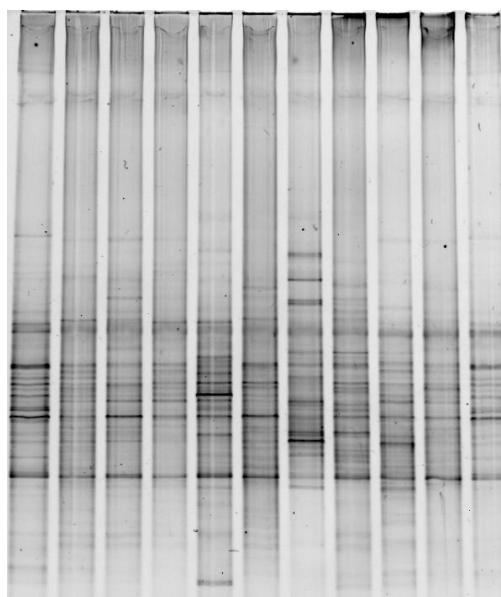


Figura 8. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante 30-55%.

Finalmente se obtuvo el perfil de diversidad con gradiente desnaturalizante 35-55% (urea y formamida) al 7% de acrilamida, obteniéndose bandas definidas, de alta intensidad y buena distribución en el gel (Figura 9). También se observaron los diez pares de muestras distribuidos en su respectivo carril.

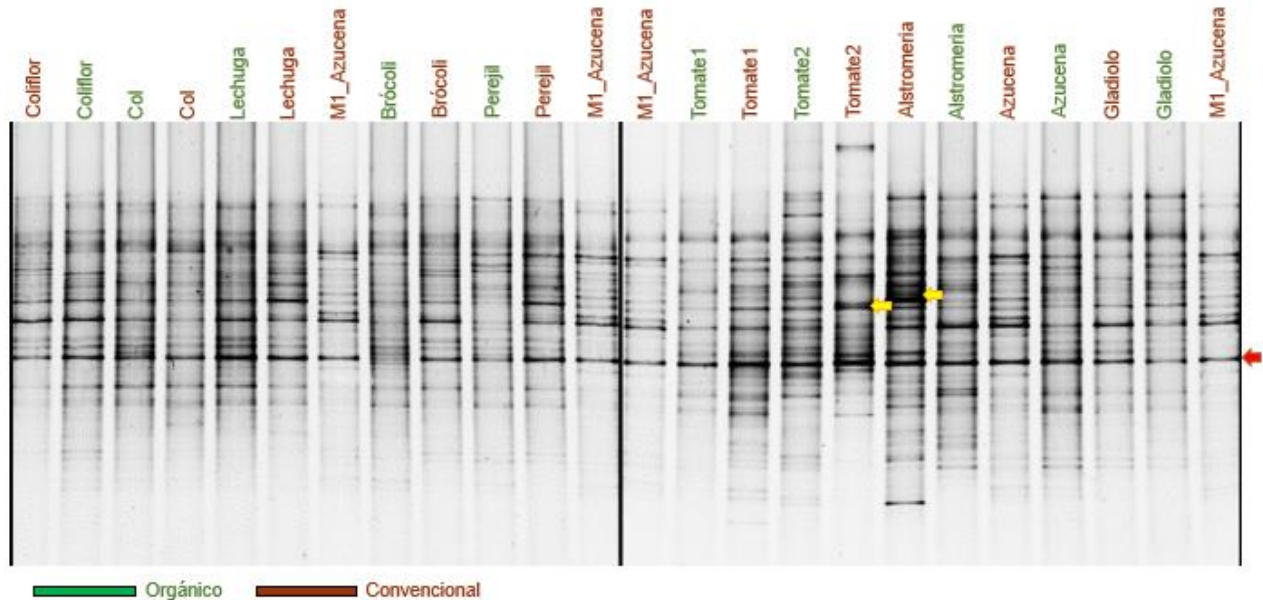


Figura 9. Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante 30-55%.

Con respecto a los perfiles de diversidad, se observa una banda común en casi todas las muestras excepto para brócoli orgánico (flecha roja). Además, en algunas muestras presentan carriles con alta intensidad y acumulación de ADN metagenómico, como es el caso de Alstromeria convencional y Tomate2 convencional (flecha amarilla). También existen muestras con bandas muy débiles y con poca intensidad como es la muestra de Tomate1 orgánico.

De la misma forma se obtuvo un primer gel de diversidad de la región ITS ADNr con gradiente desnaturalizante 30%-55% al 8% de acrilamida, observándose poca migración de las bandas; además existe una sobreacumulación de ADN y no se observan bandas definidas (Figura 10). Por lo tanto se requirió una modificación en el gradiente hasta obtener geles con bandas definidas.

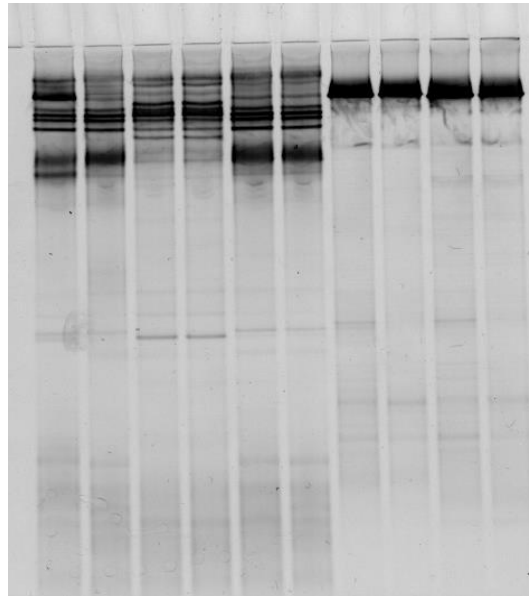


Figura 10. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturalizante 30%-55%.

Luego se obtuvo el gel con el siguiente gradiente desnaturalizante 25%-40% al 8% de acrilamida observándose de la misma manera bandas no definidas en todo el gel (Figura 11).

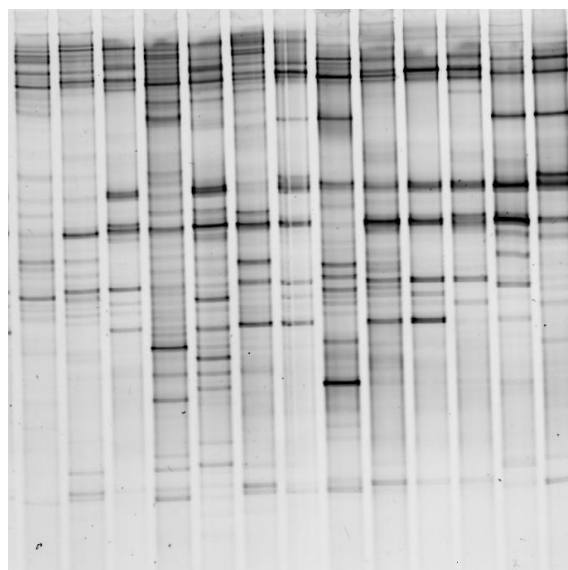


Figura 11. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturalizante 25%-55%.

Finalmente, empleando una concentración de acrilamida al 8% y un gradiente 20%-35% (urea y formamida) se obtuvieron bandas definidas, de alta intensidad y una buena distribución a lo largo del gradiente (Figura 12).

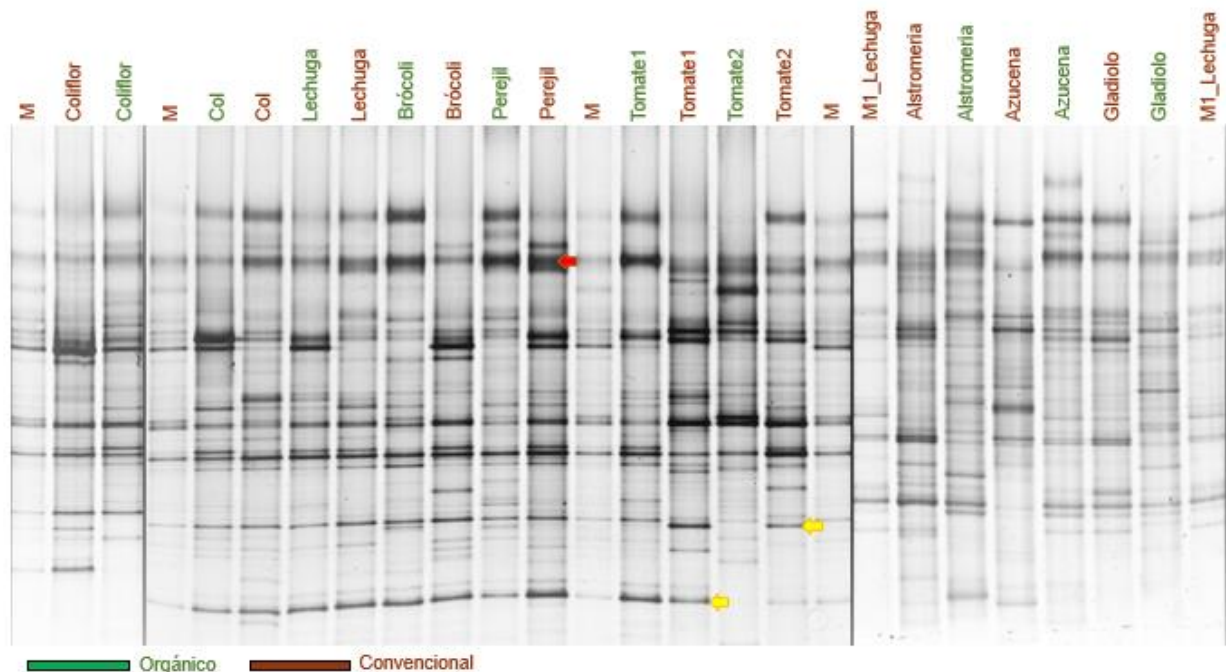


Figura 12. Perfil de diversidad de la región ITS ADNr, con gradiente desnaturalizante 20-35%.

La imagen del perfil de diversidad, es una imagen compuesta, conformada por la unión de tres geles realizados en diferentes corridas pero con las mismas condiciones y concentraciones de urea-formamida y acrilamida.

En el caso de la mayoría de las muestras pertenecientes a hortalizas existe la presencia de ciertas bandas intensas y en diferentes posiciones a nivel del carril (flecha roja) excepto para la muestras de coliflor, como también para las muestras de las flores.

En los carriles también se puede observar la existencia de bandas comunes para la mayoría de las hortalizas y a una misma altura (flecha amarilla).



7.3. Diversidad

En las imágenes de los perfiles de diversidad de la región ITS como del gen 16S, obtenidos por DGGE se observó la existencia de bandas dominantes frente a bandas débiles, lo que se supone numerosos grupos de comunidades bacterianas y fúngicas en cantidades menos dominantes; el análisis de los geles también reveló que algunas bandas eran comunes, independientemente del sistema de manejo y del tipo de cultivo.

Se realizó el análisis de estos perfiles, para determinar la riqueza, índice de diversidad de Shannon e índice de equitatividad de Shannon de las comunidades microbianas que habitan en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

En cuanto a la riqueza (S) de especies de hongos, se obtuvo un valor medio de $14,80 \pm 1,02$ para el manejo orgánico y $13,90 \pm 0,99$ para el manejo convencional; de los cuales, 3 de los 10 pares de muestras la riqueza es mayor en los cultivos orgánicos; 3 tienen igual riqueza y en los 4 pares restantes la riqueza es mayor en los cultivos convencionales (Tabla 4).

En cuanto a los valores medios del índice de diversidad de Shannon (H), oscilaron entre $2,62 \pm 0,07$ para cultivos orgánicos y $2,55 \pm 0,07$ para cultivos convencionales, resultando no ser significativamente diferentes para los dos sistemas de manejo (Tabla 4).

Los valores del índice de equitatividad de Shannon es de $0,98 \pm 0,01$ para los dos sistemas de manejo (Tabla 4).

Por lo tanto los valores obtenidos mediante la prueba estadística de t student, determinaron que la riqueza ($p = 0,679$), índice de Shannon (H) ($p = 0,753$) e índice de equitatividad de Shannon ($p = 0,171$) de la región ITS ADNr (hongos) no son significativos en los dos sistemas de manejo (Tabla 4).

De la misma manera se obtuvo los valores de riqueza (S) de especies bacterianas, con una media de $13,60 \pm 0,70$ para el manejo orgánico y $13,10 \pm 0,96$ para el manejo convencional observándose que 3 pares son mayores en cultivos orgánicos, 4 tienen



valores iguales y en 3 pares la riqueza es mayor en los cultivos convencionales (Tabla 4).

Los valores del índice de diversidad de Shannon (H), son de $2,45 \pm 0,05$ y $2,43 \pm 0,07$ para cultivos orgánicos y convencionales, respectivamente (Tabla 4).

El índice de equitatividad de Shannon es de $0,94 \pm 0,01$ para el cultivo orgánico y $0,96 \pm 0,01$ para los cultivos convencionales (Tabla 4).

Las diferencias de riqueza ($p = 0,546$), el índice de diversidad de Shannon ($p = 0,691$) y el índice de equitatividad de Shannon ($p = 0,701$) de los perfiles de diversidad del gen 16S ADNr (bacterias), tampoco son estadísticamente significativos.

Al no evidenciarse diferencias estadísticamente significativas en los índices de diversidad obtenidos en este estudio, suponemos que los dos sistemas de manejo no influenciaron sobre las comunidades microbianas de bacterias y hongos.

Aunque existan ciertas diferencias entre los valores medios de los índices de diversidad, estos no son relevantes como para afirmar que el manejo orgánico posee mayor diversidad de hongos y bacterias que el manejo convencional. Estos resultados no concuerdan con estudios anteriores citados en la literatura, que encontraron una diversidad bacteriana significativamente mayor en suelos con cultivos de uva orgánicos comparados con cultivos de uva convencionales (Vega et al. 2015). Iguales resultados obtuvieron Järvan et al. (2014), Van Diepeningen et al. (2006) y Araújo et al. (2009), los mismos que han reportado que existe mayor tamaño, diversidad y actividad de los microorganismos en suelos con manejo orgánico a diferencia del manejo convencional.

No obstante que en las dos comunidades no se logre distinguir la diversidad, una de la otra por el sistema de manejo, no significa que las dos comunidades sean exactamente idénticas ya que en este estudio no hemos analizado la identidad taxonómica de cada uno de los OTUs. Por lo tanto puede ser que el cultivo orgánico tenga la misma diversidad que el cultivo convencional o que las bandas similares correspondan a especies diferentes.

**Tabla 4.** Riqueza (S), Índice de diversidad de Shannon (H) e índice de equitatividad de Shannon (EH) a partir de perfiles de DGGE.

16S													
Manejo		Coliflor	Col	Lechuga	Brócoli	Perejil	Tomate 1	Tomate 2	Alstromeria	Azucena	Gladiolo	$\bar{x} \pm SE$	$P \leq 0,05$
Orgánico	S	15	12	11	15	15	11	21	18	17	13	14,80 ± 1,02	S 0,546
	H	2,66	2,45	2,36	2,63	2,68	2,35	2,98	2,83	2,78	2,51	2,62 ± 0,07	
	E _H	0,98	0,99	0,99	0,97	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98 ± 0,01	
Convencional	S	10	12	11	14	14	17	11	19	18	13	13,90 ± 0,99	E _H 0,701
	H	2,26	2,45	2,35	2,58	2,59	2,72	2,32	2,95	2,84	2,49	2,55 ± 0,07	
	E _H	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,96	0,97	1,00	0,98	0,97	0,98 ± 0,01	
ITS													
Manejo		Coliflor	Col	Lechuga	Brócoli	Perejil	Tomate 1	Tomate 2	Alstromeria	Azucena	Gladiolo		
Orgánico	S	15	13	13	15	16	14	12	17	11	10	13,60 ± 0,70	S 0,679
	H	2,62	2,39	2,45	2,50	2,49	2,45	2,40	2,72	2,27	2,21	2,45 ± 0,05	
	E _H	0,97	0,93	0,96	0,92	0,89	0,93	0,97	0,96	0,95	0,96	0,94 ± 0,01	
Convencional	S	14	14	13	18	16	14	13	12	7	10	13,10 ± 0,96	E _H 0,171
	H	2,56	2,52	2,47	2,77	2,62	2,45	2,41	2,41	1,91	2,21	2,43 ± 0,07	
	E _H	0,97	0,96	0,96	0,96	0,95	0,97	0,94	0,97	0,98	0,99	0,96 ± 0,01	



7.4. Composición

En los distintos algoritmos de clasificación jerárquica como UPGMA, WPGMA, SINGLE LINKAGE, COMPLETE LINKAGE y NEIGHBOR JOINING, no se observaron agrupamientos definidos de las comunidades microbianas asociados a un sistema particular de manejo de cultivos.

Sin embargo, en los dendogramas de las comunidades fúngicas (Figura 13), se encontraron dos agrupamientos, separando al cultivo de flores del cultivo de hortalizas, indistintamente del sistema de manejo. Quizás esto se deba al tipo de cultivo o que al ser generalmente cultivos perennes la aplicación de enmiendas orgánicas e insumos químicos sea más baja en comparación con las hortalizas.

De acuerdo a los resultados de las encuestas realizadas en los sitios de muestreo con manejo orgánico y convencional, se encontraron que ciertas prácticas de manejo coinciden. Por ejemplo los agricultores labran sus suelos con tracción animal y a poca profundidad (20 cm), practican la rotación de cultivos e incorporan enmiendas orgánicas (gallinaza) por cada ciclo de cultivo. En efecto, la adición de enmiendas orgánicas da lugar a un alto contenido de carbono en los suelos e incrementa la diversidad microbiana (Bonilla et al. 2012). Por lo que quizá dichas prácticas agrícolas reduzcan el impacto generado sobre los microorganismos por la aplicación de insumos sintéticos y de esta manera, se está compensando a la vida microbiana del suelo. Así también, la cantidad y calidad de los insumos utilizados para elaborar la materia orgánica afectan las propiedades físico-químicas y la microbiota del suelo, influyendo en parámetros como la biomasa, estructura y diversidad microbiana, causando efectos sobre la producción de cultivos y la salud de las plantas. Por otra parte, estudios realizados en Inglaterra por Orr et al. (2011) en comunidades bacterianas con rotación de cultivos orgánicos *versus* convencionales en suelos con cultivo de cebada, demostraron que tales prácticas agronómicas tienen un efecto significativo sobre la diversidad bacteriana en comparación con el monocultivo. También Silva et al. (2013) reportaron que diferentes rotaciones de cultivos tuvieron efectos menores sobre la diversidad bacteriana.

Con respecto a la especie vegetal cultivada tampoco se observaron agrupamientos consistentes de las dos comunidades estudiadas, no coincidiendo con Fliessbach



et al. (2007) quienes mencionan que la estructura de las comunidades microbianas está determinada por el tipo de especie vegetal y el tipo de suelo. Por lo que se cree que los microorganismos son selectivos al colonizar los suelos rizosféricos, asociándose según el tipo de raíces, los mismos que liberan exudados que son utilizados por los microorganismos como fuente nutritiva (Soroa-Bell et al. 2009 y Wieland et al. 2001).

Wu et al. (2008) hacen énfasis en que las especies vegetales -incluso los genotipos o variedades específicas- el tipo de suelo y las prácticas agrícolas son los principales impulsores de la composición de la comunidad microbiana en la rizósfera. A pesar de las diferencias reportadas en otros cultivos por los diferentes autores, al menos para nuestro estudio las diferencias no han sido evidentes.

Silva et al. (2013) y colaboradores a través de estudios realizados en Brasil concluyen que los sistemas de labranza del suelo fueron los principales factores que afectaron la diversidad bacteriana existiendo en la labranza cero una diversidad significativamente mayor que los otros tratamientos y que la labranza intensiva del suelo puede eliminar grupos de bacterias y podría comprometer la funcionalidad del suelo. Los mismos autores también mencionan que los resultados de la diversidad bacteriana analizada por DGGE pueden ser útiles como bioindicador de los cambios causados por la labranza del suelo.

En cuanto a la altitud y temperatura nuestros resultados tampoco muestran un agrupamiento definido para estos factores, coincidiendo con Fierer y Jackson (2013), quienes mencionan que la composición bacteriana entre los diferentes sistemas no está relacionada con la temperatura, altitud ni con la distancia geográfica del sitio.

Por lo tanto nuestros resultados no apoyan la hipótesis planteada de que existen diferencias en la diversidad y composición de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional. Es posible que quizá existan otros factores no evaluados en este estudio los que determinen la composición y diversidad de las comunidades microbianas de los suelos estudiados.

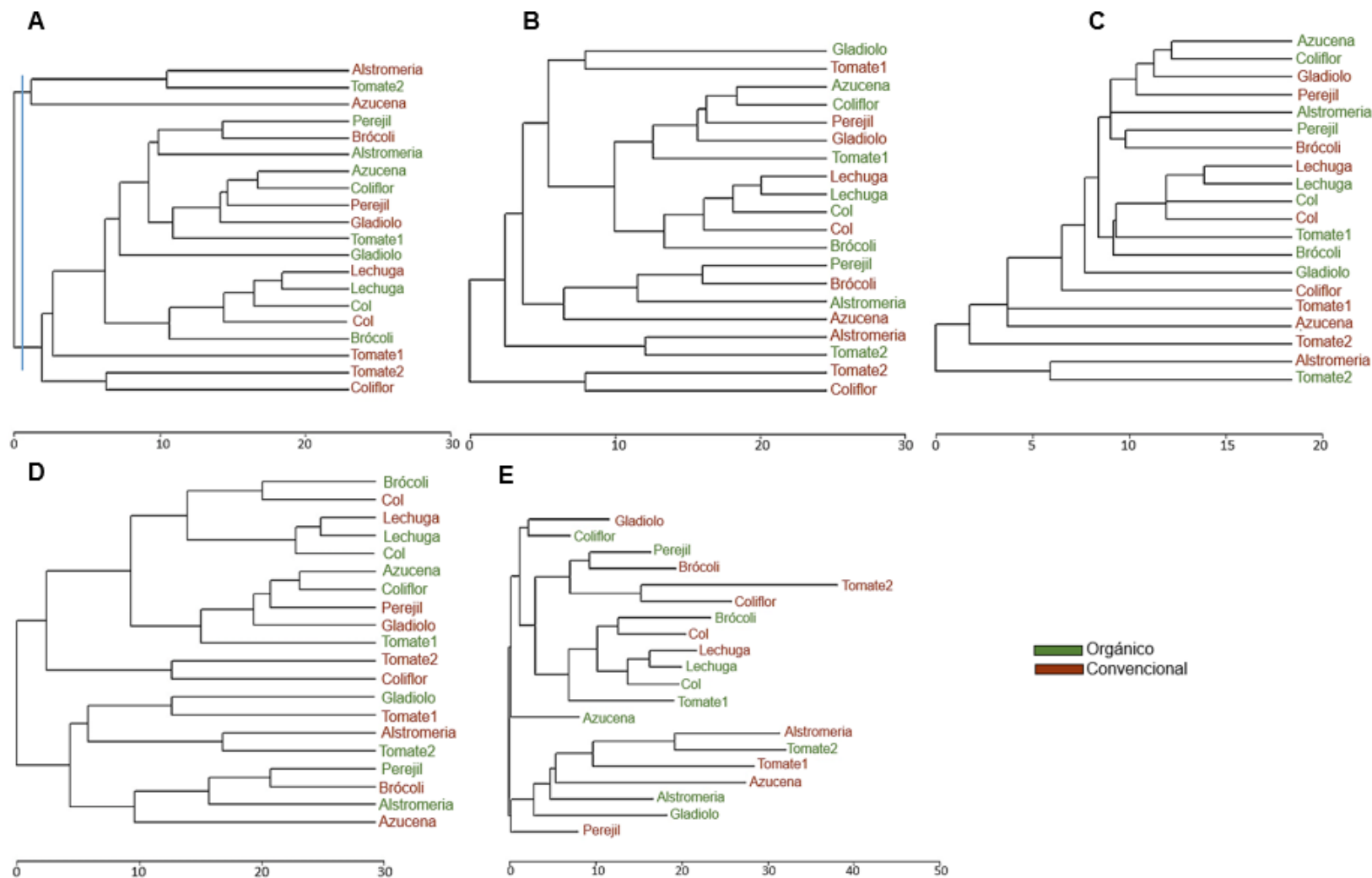


Figura 13. Dendogramas de agrupamiento del gen 16S ADNr.

A (UPGMA), **B** (WUPGMA), **C** (SINGLE LINKAJE), **D** (COMPLET LINKAJE) Y **E** (NEIGHBOR JOINING).

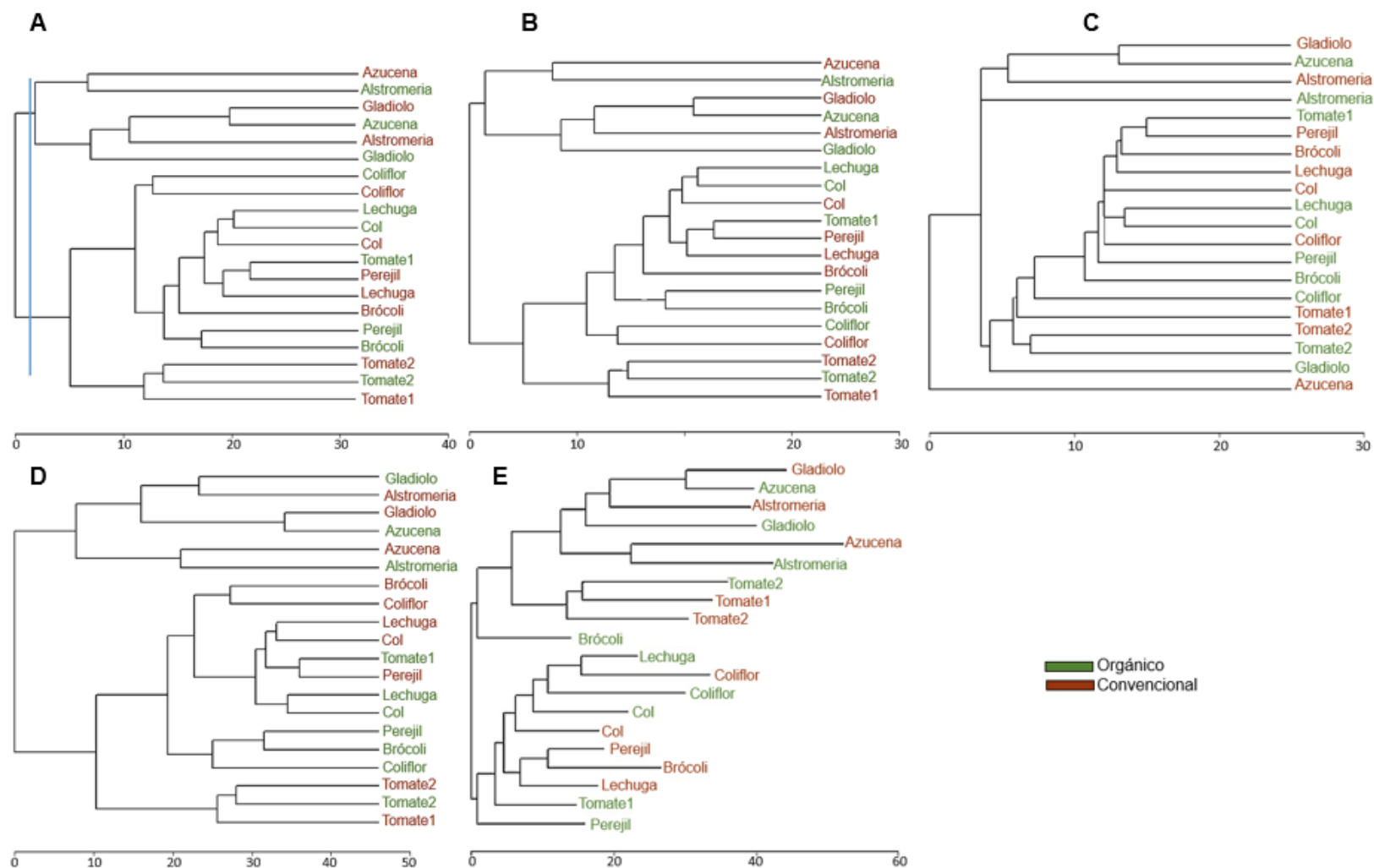


Figura 14. Dendrogramas de agrupamiento de la región ITS ADNr.

A (UPGMA), **B** (WUPGMA), **C** (SINGLE LINKAJE), **D** (COMPLET LINKAJE) Y **E** (NEIGHBOR JOINING).

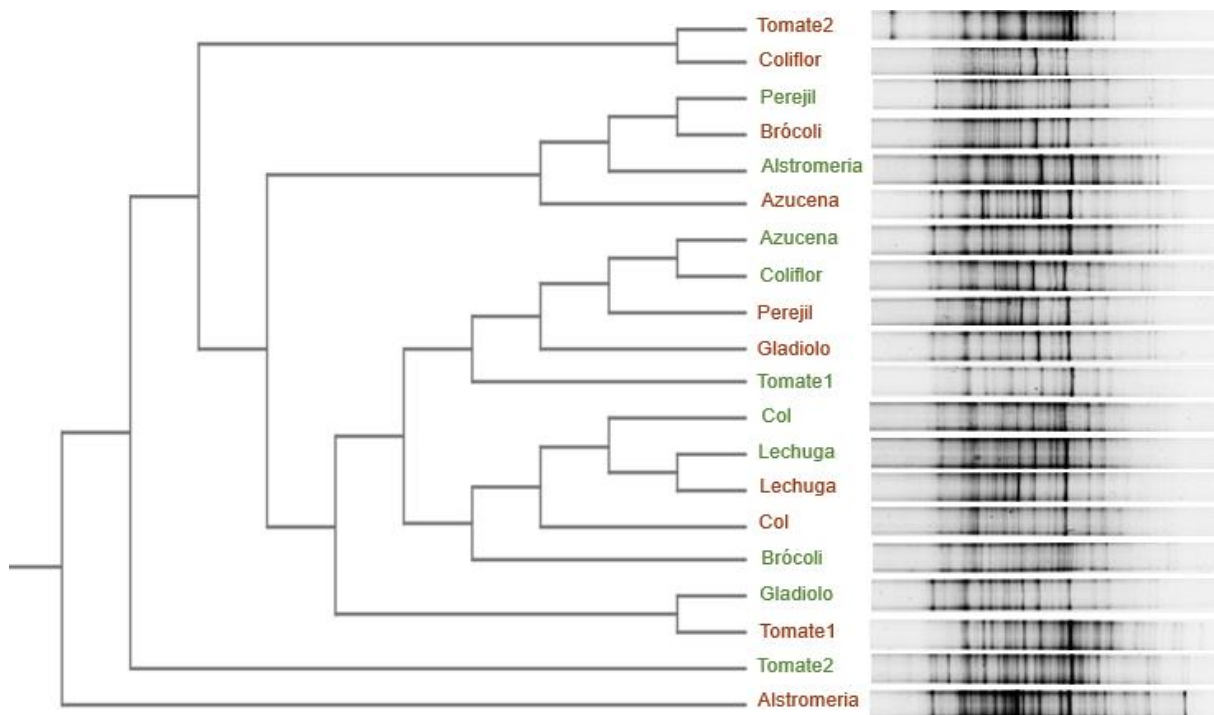


Figura 15. Árbol consenso del gen 16S ADNr.

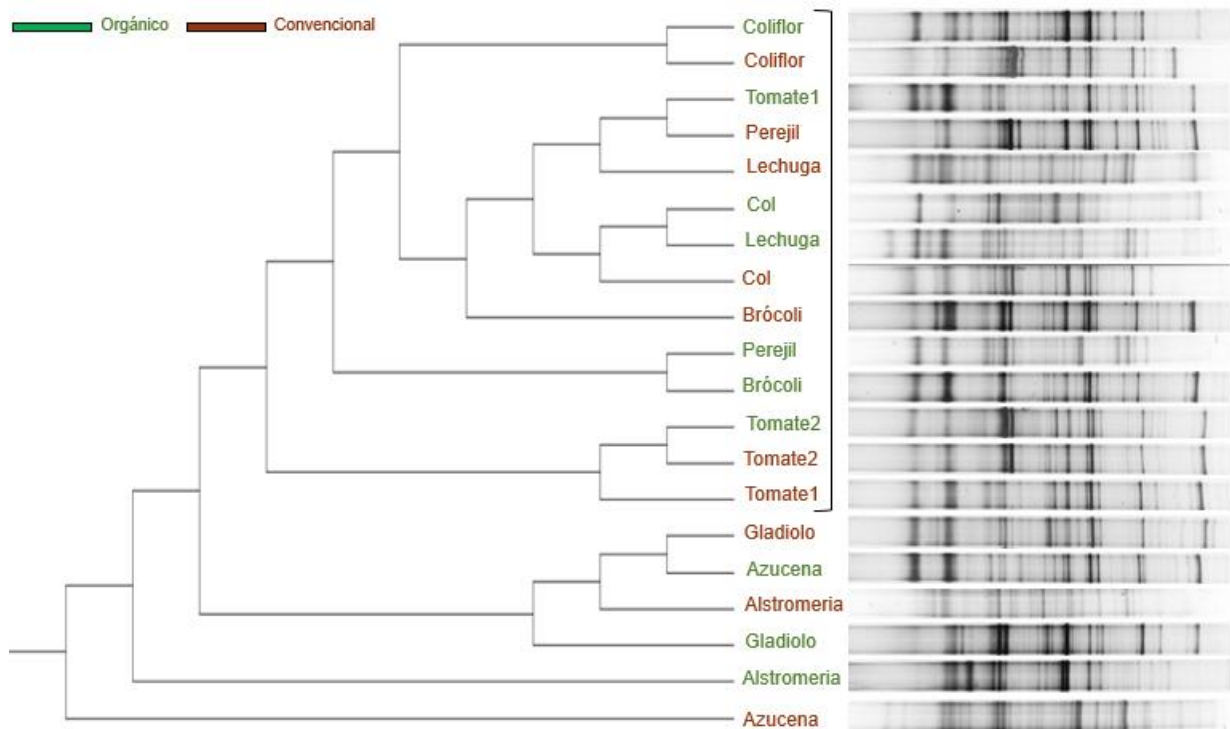


Figura 16. Árbol consenso de la región ITS ADNr.

Los árboles consenso, tanto del gen 16S ADNr (Figura 14) como de la región ITS ADNr (Figura 15), no mostraron un agrupamiento definido que esté asociado al sistema de manejo (orgánico/convencional). Sin embargo en el árbol correspondiente a la región ITS ADNr, se pudo observar un gran agrupamiento para los cultivos de



hortalizas. En cambio en el árbol consenso del gen 16S ADNr, se aprecia los mismos resultados obtenidos en los agrupamientos individuales; es decir no existen diferencias tanto en el manejo como en el tipo de cultivo.

7.5. Características físico-químicas del suelo

Según el porcentaje de arena, limo y arcilla, se trata de suelos de textura que va de franco a franco-arenosos; posee altos porcentajes de materia orgánica ($>1,5\%$) clasificándose de acuerdo con la (FAO, 2013) como suelos orgánicos; los valores de pH medios son de $6,56 \pm 0,06$ para el manejo orgánico y $6,49 \pm 0,10$ convencional, lo que los clasifica como suelos ligeramente neutros, los mismos que son adecuados para la asimilación de nutrientes por parte de las plantas; los valores de densidad aparente resultaron bajos ($<1,3 \text{ kg dm}^{-3}$), lo que indica que son suelos porosos, bien aireados y con un buen drenaje, ideal para el crecimiento de raíces (FAO 2009). La porosidad media es de $57,40 \pm 2,26$ y $52 \pm 4,03$; la densidad real está en $2,03 \pm 0,09$ para suelos orgánicos y $2 \pm 0,13$ para suelos convencionales; la conductividad eléctrica tiene un valor de $0,39 \pm 0,06$ en suelos orgánicos y $0,56 \pm 0,11$ en suelos convencionales, siendo suelos no salinos, a decir de esto se considera que son suelos con aportaciones bajas de insumos químicos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos para las variables físico-químicas mediante la t de Student tampoco mostraron diferencias significativas entre los dos sistemas de manejo (orgánico/convencional) (Tabla 5).

Tal similitud ha sido reportada anteriormente en estudios similares realizados por Shannon et al., (2002) y Vega et al., (2015). Contrario a esto, Lanzén et al., (2015) encontraron que el pH del suelo fue un factor importante en la estructura de la diversidad microbiana del suelo de montaña con pastos.



Manejo	Parámetro	Coliflor	Col	Lechuga	Brócoli	Perejil	Tomate 1	Tomate 2	Alstromeria	Azucena	Gladiolo	$\bar{x} \pm SE$	$P \leq 0,05$
Orgánico	Da	0,86	0,74	0,90	0,79	0,96	0,84	0,99	0,73	1,00	0,70	0,85 \pm 0,03	Da 0,188
	Dr	2,20	2,38	1,69	1,67	1,85	1,98	2,50	2,13	2,13	1,80	2,03 \pm 0,09	
	% P	61	69	47	53	48	57	60	65	53	61	57,40 \pm 2,26	
	pH	6,34	6,52	6,63	6,71	6,38	6,33	6,94	6,63	6,54	6,60	6,56 \pm 0,06	Dr 0,837
	C.E.	0,24	0,40	0,46	0,31	0,17	0,61	0,83	0,20	0,35	0,36	0,39 \pm 0,06	
	% M.O.	9,70	12,90	13,20	16,20	15,50	14,80	7,40	11,60	9,80	16,10	12,72 \pm 0,96	% P 0,245
	C.O %	5,63	7,48	7,66	9,40	8,99	8,58	4,29	6,73	5,68	9,34	7,38 \pm 0,56	
	% Cont.H	22,13	26,23	37,63	28,79	33,39	32,13	36,16	39,09	33,84	38,22	32,76 \pm 1,76	pH 0,527
	% Sat	51,79	50,78	53,05	47,74	50,94	54,19	51,26	58,99	50,33	57,85	52,69 \pm 1,10	
	Textura	F-a	F-a	F-a	F-a	F-a	F-a	F	F-a	F-a	F-a		
Convencional	Da	0,82	0,86	0,81	1,01	0,77	0,96	0,77	1,06	1,13	1,04	0,92 \pm 0,04	C.E. 0,228
	Dr	2,22	1,89	2,13	2,20	2,15	2,50	1,33	1,43	2,50	1,65	2,00 \pm 0,13	%M.O 0,247
	% P	63	54	62	54	64	62	43	26	55	37	52,00 \pm 4,03	
	pH	6,22	6,60	6,24	6,26	6,15	6,28	6,85	6,32	6,99	6,94	6,49 \pm 0,10	%C.O 0,175
	C.E.	0,25	0,33	0,38	0,38	0,76	0,52	0,75	1,40	0,17	0,61	0,56 \pm 0,11	
	% M.O.	10,40	16,80	14,10	10,50	12,60	7,70	10,50	9,60	6,70	11,20	11,01 \pm 0,93	%H 0,077
	% C.O	6,03	9,74	8,18	6,09	7,31	4,47	6,09	5,57	3,89	6,50	6,39 \pm 0,54	
	% Cont.H	19,51	34,30	38,61	34,62	31,26	11,20	17,63	19,10	21,10	34,50	26,18 \pm 2,99	% Sat 0,763
	% Sat	51,43	53,24	58,63	50,29	56,03	52,58	56,93	44,70	50,60	47,48	52,19 \pm 1,35	
	Textura	F	F-a	F-a	F-a	F-a	F	F-a	F-a	F-a	F-a		

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de suelos hortoflorícolas del Azuay con sistemas de manejo orgánico y convencional.

Da. (Densidad aparente), **Dr.** (Densidad real), **%P** (Porosidad), **C.E** (Conductividad Eléctrica), **%M.O** (Materia orgánica), **%C.O** (Carbono orgánico), **%Cont.H** (contenido de humedad, **% Sat**, (Saturación), **F** (Franco), **F-a** (Franco arenoso)



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los cultivos con los dos sistemas de manejo -orgánico/convencional- presentan una diversidad y composición similar a nivel de comunidades; no obstante, desconocemos a nivel taxonómico si las bacterias y hongos allí presentes son benéficos, dañinos, saprofitos o eventualistas para los cultivos.

En base a la revisión de literatura este es el primer estudio realizado en Ecuador que analiza las comunidades microbianas de suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional mediante la aplicación de la técnica DGGE, la cual resultó ser un método rápido para obtener perfiles de diversidad microbiana.

Los resultados obtenidos en esta investigación constituyen un aporte significativo al conocimiento de la microbiota de los suelos hortoflorícolas y hacen referencia a la comunidad en su totalidad (microorganismos cultivables y no cultivables); por lo que en futuras investigaciones sería relevante ampliar el estudio a nivel taxonómico de dichas comunidades con la finalidad de obtener una aproximación más cercana de las poblaciones de microorganismos que colonizan los suelos.

Los sitios de muestreo con los dos sistemas de manejo tuvieron ciertas prácticas de labranza del suelo en común por ser cultivos de ciclo corto y en pequeña escala, por lo que se recomienda seleccionar cultivos definidos, es decir que sean específicamente orgánicos o convencionales.



9. BIBLIOGRAFIA

Acuña, O; Wagner, P; Serrano, E; Pocasangre, L; Rosales, F; Delgado, E; Trejos, J; Segura, A. 1998. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. 1998: 222-233.

Araújo, ASF; Leite, LFC; Santos, VB; Carneiro, RF V. 2009. Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. Sustainability 1(2): 268-276.

Bernal Gómez, G. 2015. La microbiología de suelos en el Ecuador: Situación actual de la investigación. 2015: 1-12.

Bonilla, N; Cazorla, FM; Martínez, M; Hermoso, J; González, JJ; Gaju, N; Landa, BB; de Vicente, A. 2012. Organic amendments and land management affect bacterial community composition, diversity and biomass in avocado crop soils. Springer 357(1): 215-226.

Borneman, J; Triplett, EW. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Applied and Environmental Microbiology 63(7): 2647-2653.

Bowles, TM; Acosta Martínez, V; Calderón, F; Jackson, LE. 2014. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. Soil Biology and Biochemistry 68: 252-262.

Brito Espinoza, FA. 2014. Identificación por fenotipo , cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo " Hypericum " antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina Fidel Armando Brito Espinoza Antonio León , Ph . D ., Dir. s.l., San Francisco de Quito.

Brons, JK; Van Elsas, JD. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. Applied and Environmental Microbiology 74(9): 2717-2727.

Caiza Paucar, A. 2007. Obtención de un biofertilizante probando diferentes formulaciones como mejorador de suelo y follaje en un florícola. s.l., Universidad Internacional SEK. 83 p.

Castillo Monroy, AP; Sánchez Rodríguez, Amina Cueva, A; Orellana Ordoñez, M. 2016. Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales del suelo en ecosistemas tropicales del sur del Ecuador. Scielo 34(1): 145-154.

Cedeño, R. 2005. Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) (En modelo). 2005: 2.



Charvet, EB. 2012. Análisis comparativo de agricultura orgánica con agricultura convencional-Estudio de caso del cultivo de Brócoli. s.l., Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 1-106 p.

Díaz, G; Wachter, C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología 45(1-2): 30-40.

Van Diepeningen, AD; De Vos, OJ; Korthals, GW; Van Bruggen, AHC. 2006. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. Applied Soil Ecology 31(1-2): 120-135.

Durán Maldonado, KT; Jerves Galarza, AP. 2015. Expansión urbana de San Joaquín: 1990-2012. s.l., Universidad de Cuenca.

FAO. 2004. La horticultura y la fruticultura en el Ecuador. 2004: 1-4.

_____. 2009. Guía para la descripción de suelos. 2009: 100.

_____. 2013. El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas. 2013: 1-33.

_____. 2013. Manual de compostaje del agricultor, Experiencias en América Latina. 2013: 112.

De Felipe Antón, M. 2004. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. 70: 743-776.

Fernández, M del R; Le Borgne, S. 1987. DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. 1987: 149-174.

Ferris, MJ; Muyzer, G; Ward, DM. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. Applied and Environmental Microbiology 62(2): 340-346.

Fierer, N; Jackson, R. 2013. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. 103(3): 626-631.

Fierer, N; Schimel, JP; Holden, P a. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry 35(1): 167-176.

Fließbach, A; Mäder, P; Oberholzer, H-R; Gunst, L. 2007. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. Agriculture, Ecosystems & Environment 118(1-4): 273-284.



Garbeva, P; van Veen, J a. a; van Elsas, JDD. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review of Phytopathology 42(29): 243-270.

Godeas, A. 1983. Estudios cuali y cuantitativos de los hongos del suelo del bosque de *Nothofagus dombeyi*. s.l., 31 p.

González, H; Fierro, R. 2009. Sabias que Existen Microorganismos Que No Hemos Podido Cultivar ? 2009.

Gonzalez, P; Ye, J; Wang, S; Wang, X; Huang, D. 2014. Analysis of the occurrence and activity of diazotrophic communities in organic and conventional horticultural soils. Applied Soil Ecology 79: 37-48.

Hernández, R; Velázquez, I; Orozco, M; Santoyo, G. 2010. Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. Phytón 79: 133-139.

Higa, T; Parr, J. 1993. Microorganismos beneficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. 1993.

INEC. 2011. Reporte Estadístico el Sector Agropecuario. 2011: 1-49.

Jaramillo, DF. 2002. Introducción a la Ciencia del suelo. 2002.

Järvan, M; Edesi, L; Adamson, A; Võsa, T. 2014. Soil microbial communities and dehydrogenase activity depending on farming systems. Plant Soil Environment 60(10): 459-463.

Kisand, V; Andersson, N; Wikner, J. 2005. Bacterial freshwater species successfully immigrate to the brackish water environment in the northern Baltic. Limnology and Oceanography 50(3): 945-956.

De La Cruz Leyva, MC; Zamudio Maya, M; Corona Cruz, AI; González De La Cruz, JU; Rojas Herrera, RA. 2014. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. Scielo 2(4): 99-115.

Lanzén, A; Epelde, L; Garbisu, C; Anza, M; Martín Sánchez, I; Blanco, F; Mijangos, I. 2015. The community structures of prokaryotes and fungi in mountain pasture soils are highly correlated and primarily influenced by pH. Frontiers in Microbiology 6.

Liu, J; Yu, Y; Cai, Z; Bartlam, M; Wang, Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31(9): 1387-1395.

Maarit Niemi, R; Heiskanen, I; Wallenius, K; Lindström, K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. Journal of Microbiological Methods 45(3): 155-165.



Monokrousos, N; Papatheodorou, EM; Diamantopoulos, JD; Stamou, GP. 2006. Soil quality variables in organically and conventionally cultivated field sites. *Soil Biology and Biochemistry* 38(6): 1282-1289.

Muyzer, G. 1999. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Microbial Biosystems: New Frontiers* 1999: 10.

Muyzer, G; Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1): 127-41.

Muyzer, G; Waal, ECDE; Uitierlinden, AG. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.

Nannipieri, P; Ascher, J; Ceccherini, MT; Lan DI, L; Pietramellar, G; Renell, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54(December): 655.

Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Revista Ecosistemas* 2(2): 41-51.

Nogales, R. 2010. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 2010: 17-19.

Orr, CH; James, A; Leifert, C; Cooper, JM; Cummings, SP. 2011. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology* 77(3): 911-919.

Øvreås, L; Torsvik, V V. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial Ecology* 36(3): 303-315.

PROECUADOR. 2013. Analisis sectorial de flores. 2013: 1-52.

Rastogi, G; Sani, R. 2011. *Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment*. Springer 2011: 57.

Rondon, MR; August, PR; Bettermann, AD; Brady, SF; Grossman, TH; Liles, MR; Loiacono, KA; Lynch, BA; MacNeil, IA; Minor, C; Tiong, CL; Gilman, M; Osburne, MS; Clardy, J; Handelsman, J; Goodman, RM. 2000. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2541-2547.

Sarabia Ochoa, M; Madrigal Pedraza, R; Martínez Trujillo, M; Carreón Abud, Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Revista Biológicas* 12(1): 65-71.



Schumacher, B. 2002. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. 2002: 23.

Shannon, D; Sen, a M; Johnson, DB. 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. Soil Use and Management 18: 274-283.

Silva, a P; Babujia, LC; Matsumoto, LS; Guimarães, MF; Hungria, M. 2013. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an oxisol of Southern Brazil. The Open Agriculture Journal 7: 40-47.

Soroa-Bell, MR; Hernández-Fernández, A; Soto-Carreño, F; Terry-Alfonso, E. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizosfera de gerbera y su efecto en la productividad. Revista Chapingo sep. 2009.

Suárez, Y. 2010. Analisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de para criolla (Solanum phureja) mediante una aproximación metagenomica. s.l., Nacional de Colombia. 1-128 p.

Tapia, M. 2014. Prácticas y saberes ancestrales de los agricultores de San Joaquín. s.l., Universidad Politecnica Salesiana de Cuenca. 198-201 p.

Vallejo, V; Mijangos, I; Garbisu, C. 2010. Biodiversidad edáfica como bioindicador de la salud del suelo mediante métodos moleculares. s.l., 15 p.

Vega, AD; Gumiere, T; Andrade, PAM; Lima Perim, JE; Durrer, A; Baigori, M; Vazquez, F; Andreote, FD. 2015. Bacterial communities in the rhizosphere of Vitis vinifera L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. Antonie van Leeuwenhoek 107(2): 575-588.

White, T. J; Bruns, T. D; Lee, S. B; Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. no.January.

Wieland, G; Neumann, R; Backhaus, H. 2001. Variation of Microbial Communities in Soil , Rhizosphere , and Rhizoplane in Response to Crop Species , Soil Type , and Crop Development Variation of Microbial Communities in Soil , Rhizosphere , and Rhizoplane in Response to Crop Species , Soil Type , an. Applied and Environmental Microbiolgy 67(12): 5849-5854.

Will, C; Thurmer, A; Wollherr, A; Nacke, H; Herold, N; Schrumpf, M; Gutknecht, J; Wubet, T; Buscot, F; Daniell, R. 2010. Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 76(20): 6751-6759.

Von Wintzingerode, F; Göbel, UB; Stackebrandt, E. 1997. Determination if microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. FEMS microbiology 21: 213-229.



Wu, B; Tian, J; Bai, C; Xiang, M; Sun, J; Liu, X. 2013. The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. The ISME journal 7(7): 1299-309.

Wu, T; Chellemi, DO; Graham, JH; Martin, KJ; Roskopf, EN. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. Microbial Ecology 55(2): 293-310.

Yao, H; He, Z; Wilson, MJ; Campbell, CD. 2000. Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changin Land Use. Springer 2000: 223-237.

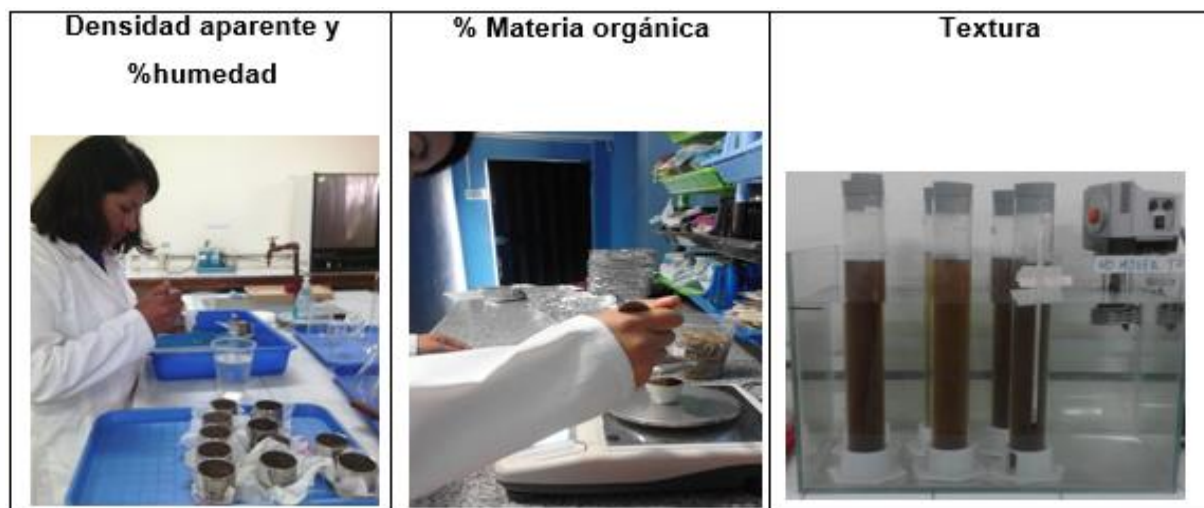
Zwart, G; Bok, J. 2004. Protocol DGGE. Center for Limnology 4(March): 1-6.

10. ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestras de suelos



Anexo 2. Análisis físicos-químicos



Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN metagenómico.



Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times

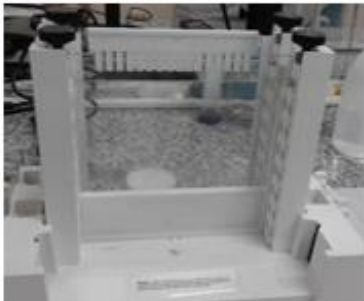
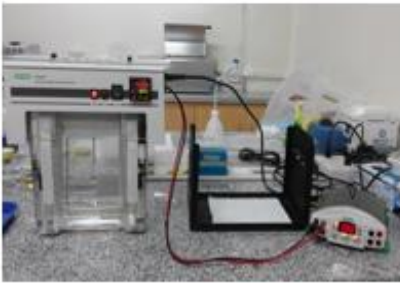
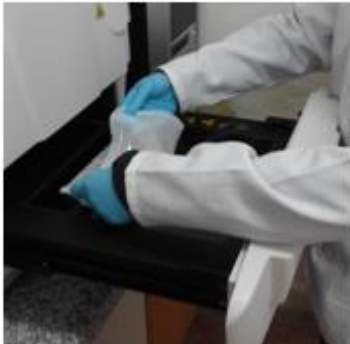
1. To the **PowerBead Tubes** provided, 0.25 grams of soil sample.
2. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution C1.** If **Solution C1** is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60 µl of **Solution C1** and invert several times or vortex briefly.
5. Secure **PowerBead Tubes** horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog# 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.
Note: If you are using the 24 place Vortex Adapter for more than 12 preps, increase the vortex time by 5-10 minutes.
6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.
7. Transfer the supernatant to a clean **2 ml Collection Tube** (provided).
Note: Expect between 400 to 500 µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
8. Add 250 µl of **Solution C2** and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.
9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
10. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 600 µl of supernatant to a clean **2 ml Collection Tube** (provided).
11. Add 200 µl of **Solution C3** and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
13. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 750 µl of supernatant into a clean **2 ml Collection Tube** (provided).
14. Shake to mix **Solution C4** before use. Add 1200 µl of **Solution C4** to the supernatant and vortex for 5 seconds.
15. Load approximately 675 µl onto a **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675 µl of supernatant to the **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.
Note: A total of three loads for each sample processed are required.
16. Add 500 µl of **Solution C5** and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
17. Discard the flow through.
18. Centrifuge again at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
19. Carefully place spin filter in a clean **2 ml Collection Tube** (provided). Avoid splashing any **Solution C5** onto the **Spin Filter**.
20. Add 100 µl of **Solution C6** to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog# 17000-10).
21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
22. Discard the **Spin Filter**. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). **Solution C6** contains no EDTA. To concentrate the DNA see the Hints & Troubleshooting Guide.

Anexo 4. Equipo para PCR

<p>Mezcla de reactivos para la amplificación del ADN por PCR</p> 	<p>Muestras en el termociclador</p> 	<p>Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR</p> 
---	--	---

Anexo 5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

<p>Ensamblaje del equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)</p> 	<p>Corrida electroforética</p> 	<p>Foto-documentación del gel de DGGE</p> 
--	--	---

Anexo 6. Concentraciones de reactivos de SuperMix

invitrogen
by *life* technologies™

Platinum® PCR SuperMix

Cat. nos.	Size	Store at -30°C to -10°C
11306-016	100 reactions	
11306-081	5000 reactions	
Pub. Part no. 11306.pps	MAN0000950	Rev. Date 10 Apr 2012

Description

Platinum® PCR SuperMix provides qualified reagents for the amplification of nucleic acid templates by polymerase chain reaction (PCR). The mixture contains anti-*Taq* DNA polymerase antibody, Mg⁺⁺, dNTPs, and recombinant *Taq* DNA polymerase at concentrations sufficient to allow amplification during PCR. Platinum® PCR SuperMix is supplied at 1.1X concentration to allow approximately 10% of the final reaction volume to be used for the addition of primer and template solutions. Reagents sufficient for 100 or 5000 amplification reactions of 50 µL each are provided.

Anti-*Taq* DNA polymerase antibody inhibits polymerase activity providing an automatic "hot start" (Chou, 1992; Sharkey, 1994) and permits ambient temperature set-up. Antibody-mediated hot starts improve PCR specificity and yield (Westfall, 1997). Due to specific binding of the antibody, Platinum® PCR SuperMix is present in an inactive form and is reactivated after a denaturation step in PCR cycling at 94°C.

Platinum® PCR SuperMix may be stored at either -30°C to -10°C or 2°C to 8°C. Storage at 2°C to 8°C avoids the necessity of thawing the mix before assembling the PCR. No detectable reduction of PCR performance or enzyme activity is observed after storage of Platinum® PCR SuperMix for 12 months at 2°C to 8°C. Repeated freeze-thaw cycles do not reduce performance or activity.

Component	100-rxn size	5000-rxn size
Platinum® PCR SuperMix	4 × 1.125 mL	4 × 56.25 mL

Product Use: For research use only.

Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Components

22 U/mL complexed recombinant *Taq* DNA polymerase with Platinum® *Taq* Antibody, 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, and stabilizers.